

**Photo-Oxidationsprodukte
von Benzo(a)pyren:
Untersuchungen zur Stabilität
sowie zur Kanzerogenität
im Ciliaten-Phototoxizitätstest
und im
Chlamydomonas-Mutagenitätstest**

vorgelegt von

Ursula Bader

aus Stuttgart



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Photo-Oxidationsprodukte
von Benzo(a)pyren:
Untersuchungen zur Stabilität
sowie zur Kanzerogenität
im Ciliaten-Phototoxizitätstest
und im
Chlamydomonas-Mutagenitätstest**

Den naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Ursula Bader
aus Stuttgart

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung:

21. November 1980

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr. Wegener

Erstberichterstatter:

Professor Dr. Arnold

Zweitberichterstatter:

Professor Dr. Dr. Gräf

Drittberichterstatter:

Professor Dr. Kessler

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Theoretischer Teil	4
1. Korrelation zwischen Phototoxizität und Kanzerogenität	4
2. Korrelation zwischen Mutagenität und Kanzerogenität	8
C. Experimenteller Teil	18
1. Auftrennung und Charakterisierung der Photo-Oxidationsprodukte von Benzo(a)pyren	18
2. Quantitative Untersuchungen zur Stabilität bzw. Lichtempfindlichkeit von Benzo(a)pyren und Benzo(a)pyren-chinonen	26
3. Phototoxizitätsuntersuchungen an Tetra- hymena pyriformis	40
4. Mutagenitätsuntersuchungen an Chlamydomonas reinhardtii	55
D. Diskussion	75
E. Zusammenfassung	80
F. Literaturverzeichnis	82
<u>Verzeichnis der Abkürzungen</u>	106

A. EINLEITUNG

Unter der Vielzahl der heute bekannten exogenen Krebsnoxen besitzen die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) infolge ihres ubiquitären Vorkommens in Luft, Lebensmitteln, Wasser und Boden (Übersichten bei Boyland et al. 1973, Preussmann 1975) ohne Zweifel die größte umwelthygienische Relevanz. Nicht zu Unrecht hat bereits vor Jahrzehnten K.H.Bauer die Leitsubstanz dieser Stoffgruppe, das Benzo(a)pyren (B(a)p), als eine "Schicksalssubstanz der Menschheit" apostrophiert. Die stetige Neuproduktion dieser Kanzerogene, bedingt durch zivilisationsbedingte Pyrolysevorgänge (Übersicht bei Preussmann 1975) und durch biogene Synthese im Pflanzenbereich (Gräf und Diehl 1966, Borneff et al. 1968) sowie durch Bakterien (Knorr und Schenk 1966) verleiht der sog. Umwelthalbwertszeit dieser Stoffe zur Einschätzung des exogenen Krebsrisikos einen erheblichen Stellenwert.

B(a)p zählt zu den lichtempfindlichsten PAK (Karatsune und Hirohuta 1962). Seine Abbaugeschwindigkeit ist abhängig von der Wellenlänge und Intensität der Strahlung, von atmosphärischen Bedingungen (Sauerstoff, Stickstoff, SO_2 -Gehalt der Luft), von der Art des Lösungsmittels (Aceton, Benzol, Oktan, Wasser usw.) bzw. des Adsorptionsmittels (Glas, Silicagel, Al_2O_3 , Ruß), von der Ausgangskonzentration, von der Temperatur usw. (Borneff und Knerr 1959, Karatsune und Hirohuta 1962, Woenckhaus et al. 1962, Isbell und Tipson 1964, Breinlich 1964, Masuda und Karatsune 1966, Jäger und Kassowitzowa 1968, Andelmann und Suess 1969, Paalme und Gubergrits 1967, 1968, 1971, Tebbens et al. 1971, Mailath et al. 1974, 1975, Seifert 1977). Nach Borneff und Knerr (1959) werden unter Berücksichtigung der Löslichkeits- und Adsorptionsverhältnisse in Ruß, Motorenabgasen, Autoreifen und Straßenteerabrieben und unter Berücksichtigung der Spektralabsorption dieser Trägerstoffe durch Tageslicht schätzungsweise 20 - 50 % der täglich in die Luft emittierten B(a)p-Mengen durch

Photo-Oxidation zerstört. Die Abhängigkeit dieser Umsetzungsprozesse von der jahreszeitlich bedingten Strahlungsintensität haben kontinuierliche Messungen von verschiedenen Arbeitsgruppen übereinstimmend bewiesen (Sawicki et al. 1962, Hettche 1963, Schlipköter et al. 1965, Waibel und Wanner 1974, Gräf 1976); während der lichtstarken Sommermonate sinkt der B(a)p-Gehalt im Luftaerosol in Großstädten erheblich ab (Abb. 1).

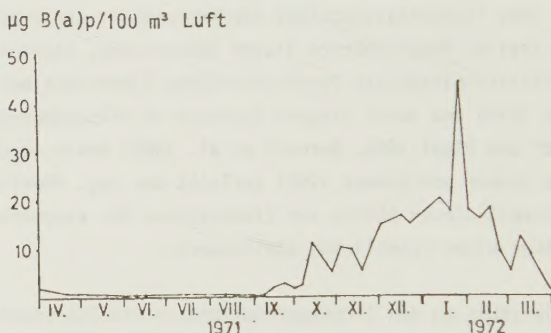


Abb. 1: Jahreszeitlich bedingte Schwankungen des Gehaltes an Benzo(a)pyren in der Stadtluft Erlangens (nach Gräf 1976).

Wenig Beachtung hat die Frage gefunden, ob die photochemischen Umsetzungsprodukte der kanzerogenen PAK ihrerseits noch eine relevante kanzerogene Potenz besitzen. Die Tatsache, daß im Immissionsaerosol bei Sonneneinstrahlung erhebliche Anteile dieser Kanzerogene vernichtet bzw. abgebaut werden, wurde bisher als wesentlicher Faktor der limitierten Umweltpersistenz dieser Schadstoffgruppe angesehen (Tebbens et al. 1971).

Erst kürzlich veröffentlichte Untersuchungen von Gräf und

Haller (1977) legen jedoch die Vermutung nahe, daß die durch Licht entstandenen Folgeproduktgemische der PAK noch kanzerogene Aktivität besitzen.

Ziel unserer Untersuchungen war es, die Frage nach der Kanzerogenität der einzelnen Photo-Oxidationsprodukte von B(a)p mit Hilfe von Phototoxizitäts- und Mutagenitätstests weiter zu klären. Ergänzend sollten Untersuchungen zur Umweltpersistenz, d.h. zur Stabilität relevanter B(a)p-abbauprodukte durchgeführt werden. Im vorliegenden Beitrag wird über die diesbezüglichen Untersuchungsergebnisse berichtet und außerdem auf die Korrelation zwischen Kanzerogenität und Mutagenität sowie Kanzerogenität und Phototoxizität bzw. die Aussagekraft von Phototoxizitäts- und Mutagenitätstests näher eingegangen.

B. THEORETISCHER TEIL

1. Korrelation zwischen Phototoxizität und Kanzerogenität

Die photodynamische bzw. phototoxische Erscheinung besteht in einer Sensibilisierung bzw. Schädigung biologischer Objekte unter Lichteinwirkung in Gegenwart von Photosensibilatoren. Die Versuchsobjekte überleben die Beleuchtung mit ultravioletter oder sichtbarer Strahlung bestimmter Intensität ohne Schäden. Das gleiche gilt auch für die Zugabe von nicht toxischen Konzentrationen der Photosensibilatoren im Dunkeln. Bei Lichteinwirkung führen diese Konzentrationen aber zu einer Schädigung der Versuchsorganismen und letzten Endes zu deren Tod.

Die Entdeckung dieses Phänomens geht auf Oscar Raab (1900) zurück. Er beobachtete bereits Ende des 19. Jahrhunderts, daß der fluoreszierende Farbstoff Akridin in hochverdünnten wässrigen Lösungen auf den Einzeller *Paramecium* bei Lichteinwirkung starke zytotoxische Wirkung entfaltet und bezeichnete diese als "photodynamischen Effekt". Nach Erkennung der ebenfalls fluoreszierenden PAK als Krebsnoxen wurde deren photodynamische Wirksamkeit in vielerlei Hinsicht experimentell untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß das stark kanzerogene B(a)p unter Belichtung und in Gegenwart von Sauerstoff an den verschiedensten Versuchsorganismen wie Säugern, Insekten und Crustaceen, Protozoen, Ascomyceten und Zellkulturen stark photodynamisch wirkt. Auch die oxidative Degradation unbelebter Substrate, wie Enzyme und Nukleinsäuren, wurde durch B(a)p unter Lichteinwirkung beeinflusst. Bemerkenswert ist weiterhin die UV-Sensibilisierung der Haut durch PAK, die bei Teearbeitern schon im zeitigen Frühjahr eine Art "Sonnenbrand" bedingt (Zorn 1978). Daß B(a)p an der menschlichen Haut photodynamisch wirksam ist, ist durch Burckhardt seit

1937 bekannt. Eine Zusammenfassung der Versuchsobjekte, an denen die photodynamische Wirksamkeit von B(a)p nachgewiesen wurde, befindet sich in Tabelle 1.

Daß die Stärke der photodynamischen Aktivität in enger Relation zur kanzerogenen Potenz der PAK steht, wurde zum ersten Mal von Mottram und Doniach (1938) und Doniach (1939) diskutiert, nachdem sie die Phototoxizität von einigen PAK an den Protozoen *Coleps* und *Paramecium* überprüft hatten.

In weiteren vergleichenden Untersuchungen über die relative Phototoxizität verschiedener PAK und ihre jeweilige kanzerogene Potenz an *Paramecium*arten (Calcutt 1954, Stephano 1961), an Erythrozyten, Mitochondrien und DNS (Wolman 1940, Alexander und Fox 1954, Santamaria 1963) sowie an der menschlichen Haut (Wulf et al. 1963) erwiesen sich in der Regel die kanzerogensten Vertreter dieser Stoffgruppe auch als phototoxisch am wirksamsten. Keine derartige Korrelation fanden Graffi et al. (1953) bei der Untersuchung von allerdings nur 4 PAK an Hefepilzen und Morimura et al. (1964) bei der Prüfung von nur 6 PAK an HeLa-Zellkulturen. Die umfangreichsten Untersuchungen – mit 157 PAK – wurden bisher von Epstein et al. (1964) an *Paramecium caudatum* durchgeführt. Als Ergebnis wurde festgestellt, daß phototoxisch sehr aktive Verbindungen mit einer 4 mal höheren Wahrscheinlichkeit auch kanzerogen wirken als Aromaten mit geringer bzw. ohne phototoxische Aktivität – ein Ergebnis, das einen Phototoxizitätstest als einfachen Vor-Kanzerogenitätstest zuläßt. Auch neuere Untersuchungen von Malling und Chu (1970) an Konidien von *Neurospora crassa* und Zellkulturen des Chinesischen Hamsters zeigen eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Phototoxizität und Kanzerogenität. Damit übereinstimmende Ergebnisse fanden erst kürzlich Bauer und Gräf (1976) an *Tetrahymena pyriformis* und Morgan und Warshawsky (1977) an Larven der Crustaceen *Artemia salina*. Die beiden letztgenannten Autoren schließen aus ihren Untersu-

Versuchsobjekte	Literatur
Mensch: menschliche Haut	Burckhardt 1937 Wulf et al. 1963
Säuger: Mäusehaut	Santamaria et al. 1966
Insekten: <i>Drosophila melanogaster</i>	Matoltsy und Fabian 1946
Crustaceen: <i>Artemia salina</i>	Morgan und Warshawsky 1977
Ciliaten: <i>Paramecium caudatum</i>	Doniach 1939 Stephano 1961 Epstein et al. 1963, 1964
<i>Paramecium bursaria</i>	Calcutt 1954
<i>Coleps hirtus</i>	Mottram und Doniach 1938
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Bauer und Gräf 1976 Bauer 1977 Gräf und Haller 1977
Ascomyceten: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Graffi et al. 1953 b
<i>Neurospora crassa</i>	Malling und Chu 1970
Zellkulturen: Somazellen des Chinesischen Hamsters	Malling und Chu 1970
Embryozellen des Huhns	Lewis 1935
menschliche Gewebekulturen	Bauer 1977
HeLa-Zellen	Morimura et al. 1964
Erythrozyten	Wolmann 1940
Makromoleküle: DNS und Polymethylacrylsäure	Alexander und Fox 1954
Proteine	Reske und Stauff 1964
Mitochondrien der Rattenleber	Graffi et al. 1953 a Santamaria 1963
Urease	Mueller und Rusch 1943

Tab. 1: Photodynamische Wirkung von B(a)p

chungen mit 41 PAK, daß eine hohe photodynamische Wirkung nur den kanzerogenen Verbindungen mit 4 oder 5 aromatischen Ringen zukommt.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Beobachtungen von Santamaria et al. (1966) sowie von Cavalieri und Calvin (1971), nach denen die experimentelle Krebsinduktion bei Mäusen durch B(a)p bei Belichtung der Versuchstiere eine erhebliche Förderung erfährt. In anderen Veröffentlichungen wurde allerdings ein gegenteiliger Effekt beschrieben (Morton et al. 1942, Doniach und Mottram 1940, Miller 1950).

Was den Wirkungsmechanismus des photodynamischen Effekts betrifft, so bestehen noch viele Unklarheiten (Epstein et al. 1963, Chromwell 1965, Wiebel und Gelboin 1974). Nach Ts'o et al. (1964) bindet sich B(a)p physikalisch an die DNS; wird dieser Komplex mit Schwarzlicht (NUV) bestrahlt, so binden sich B(a)p oder seine Photo-Oxidationsprodukte kovalent an die DNS. Morgan und Warshawsky (1977) sowie Malling und Chu (1970) vermuten, daß die Kanzerogenität der PAK möglicherweise das Resultat eines subletalen photodynamischen Effektes ist.

Wenn auch der Zusammenhang der relativen Phototoxizität und der kanzerogenen Potenz von PAK noch nicht vollständig geklärt ist, so bieten sich aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse zur Parallelität von Phototoxizität und Kanzerogenität einfache Phototoxizitätstests, insbesondere mit Einzelzellen, als mikrobiologische Kanzerogenitätsschnelltests an.

Für unsere Versuche verwendeten wir die von Gräf und Haller (1977) sowie Bauer und Gräf (1976) standardisierten Tests mit *Tetrahymena pyriformis*, die bisher eine weitgehende Übereinstimmung zwischen phototoxischer Wirksamkeit und kanzerogener Potenz verschiedener PAK aufwiesen.

2. Korrelation zwischen Mutagenität und Kanzerogenität

Mutationen stellen Veränderungen im Bereich der erblichen Veranlagung eines Organismus dar (Gottschalk 1978). Im Hinblick auf die Art der mutativen Veränderungen unterscheidet man Gen-, Chromosomen- und Genommutationen, im Hinblick auf die Art der Zellen, in denen sie auftreten, generative und somatische Mutationen.

Mutationen in den somatischen Zellen können nur für den Träger selbst gefährlich werden. Eine echte genetische Gefahr stellen dagegen nur solche Mutationen dar, die in generativen Zellen auftreten, nicht durch DNS-Repair Mechanismen beseitigt werden und damit auf die Nachkommenschaft übertragen werden können. Bei Organismen, die sich vegetativ fortpflanzen, können natürlich auch somatische Mutationen auf die Nachkommenschaft übertragen werden (Gebhart 1977a, Gottschalk 1978).

Von B(a)p konnten inzwischen in Testsystemen mit somatischen und generativen Zellen sowie mit Mikroorganismen Gen- bzw. Chromosomenmutationen nachgewiesen werden (Tab. 2).

Die Diskussionen über Zusammenhänge zwischen Mutagenität und Kanzerogenität reichen bis ins 19. Jahrhundert zurück. So beobachtete Hanseman bereits 1890 in Tumorzellen Anomalien der Kernteilung, die zu veränderten Chromosomenmustern führen. Auf der Basis solcher Beobachtung formulierte T. Boveri (1914) seine "Chromosomentheorie maligner Tumoren", die im wesentlichen besagte, daß Tumorzellen eine von der Norm abweichende Chromosomenzahl enthalten, deren Ursache und Voraussetzung überstürzte Zellteilungen zu sein scheinen. K.H. Bauer (1928) erweiterte Boveris Chromosomentheorie zur "Mutationstheorie des Krebses". Danach führen kanzerogene Reize, seien sie physikalischer oder chemischer Natur, zu Mutationen in somatischen

Testorganismen	Zellsysteme	Mutationstyp	Literatur
in vivo Methoden	Maus, Chinesischer Hamster	Chromosomenmutationen	Basler und Röhrborn (1976)
	Chinesischer Hamster	Chromosomenmutationen	Basler und Röhrborn (1976) Bayer und Bauknecht (1977)
in vitro Methoden mit metabolischer Aktivierung	Mensch	Chromosomenmutationen	Rüdiger et al. (1976) Weinstein et al. (1977)
	Chinesischer Hamster, Goldhamster	Genmutationen	Krahn und Heidelberg (1977) Huberman (1975)
	Mikroorganismen: Salmonella typhimurium	Genmutationen	Ames et al. (1975)

Tab. 2: Positive Mutagenitätsbefunde mit B(a)p

Zellen. Diese Mutationen ziehen wachstumsregulierende Funktionen in Mitleidenschaft. Dadurch wird auf eine einfache Art und Weise das "genetische Gedächtnis" einer Tumorzelle interpretiert, das dafür sorgt, daß aus Krebszellen immer wieder Krebszellen des gleichen Typs entstehen (Abb. 2).

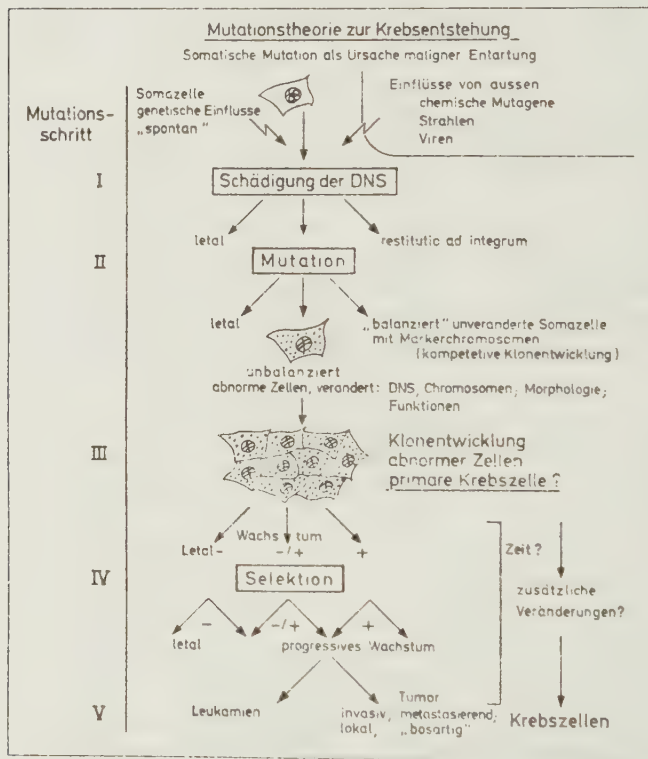


Abb. 2: Eine Somazelle erfährt eine Schädigung z.B. durch chemische Mutagene, Viren oder Strahlen. Dieser Schaden (I) kann sichtbar gemacht werden und stellt sich in Form von Chromosomenbrüchen dar. Die Zelle hat die Möglichkeit, den Schaden vollständig zu restituieren, sie geht zugrunde oder sie überlebt mit einer Mutation (II). Diese Mutation kann nach den nächsten Teilungszyklen tödlich

sein, sie kann aber auch zu unverändertem Weiterleben der Zelle in den nachfolgenden Generationen führen, wenn das genetische Material lediglich umgestaltet, jedoch nicht nachhaltig verändert würde, z.B. in Gestalt einer balanzierten reziproken Translokalisierung zweier Chromosomenabschnitte.

Zellen mit unbalanzierten Veränderungen am genetischen Material können nach kurzer Zeit unter dem Druck der Abwehrkräfte und Selektion eingehen. Sie können aber auch gegenüber der Umgebung im Selektionsvorteil sein und ungehindert zu einem Zellklon heranwachsen. Ein Klon (III) besteht aus der Summe aller Zellen, die aus der ersten mutierten Einzelzelle hervorgegangen sind und infolgedessen alle dieselben Merkmale tragen: Markierungschromosomen, morphologische Besonderheiten oder biochemisch meßbare Eigenschaften, die sie von den übrigen Somazellen unterscheiden. Im Schema besteht dieser Klon aus veränderten Zellen, die schließlich eine progressive Wachstumsperiode (IV) durchlaufen und in einer unbekannten Zeit als Tumor- oder Leukämie-Zelle (V) klinisch in Erscheinung treten (aus Schroeder 1972).

Mit der Fortentwicklung der genetischen Forschung wurden die von der Mutationstheorie geforderten Parallelitäten zwischen Auslösung somatischer Mutationen und Krebsentstehung zwar in zahlreichen Einzelfällen immer wieder bestätigt, in manchen Fällen waren sie dagegen nicht im erwarteten Maße aufzuzeigen (Übersicht bei Gebhart 1977b, Brookes 1977). So konnte z.B. mit den als kanzerogen bekannten polyzyklischen Kohlenwasserstoffverbindungen, aromatischen Aminen und Azofarbstoffen bei Phagen, Bakterien und *Drosophila* keine oder nur eine zweifelhafte mutagene Wirkung nachgewiesen werden.

Burdette faßte 1955 die bisherigen Ergebnisse zu diesem Thema zusammen und verneinte jeglichen Zusammenhang zwischen Mutagenität und Kanzerogenität. Seine Meinung war für die nächsten 10 Jahre vorherrschend. Erst die Erkenntnis, daß verschiedene Chemikalien im Körper zuerst metabolisiert werden müssen, ehe sie ihre biologischen Wirkungen entfalten können,

brachte einen weiteren Durchbruch bei der Schließung der noch offenen Lücken in der Parallelität zwischen mutagener und kanzerogener Wirkung. Es zeigte sich nämlich, daß einige chemisch recht träge erscheinende und bei in-vitro-Mutagenitätstests mehr oder weniger wirkungslose Kanzerogene erst im Organismus in die eigentlichen "Wirkformen", die sogenannten "ultimate carcinogens" umgewandelt werden, die dann nicht nur in bekannter Weise kanzerogen, sondern auch mutagen sind.

So ergaben in-vitro-Mutagenitätsuntersuchungen an *Salmonella typhimurium*-Stämmen unter gleichzeitiger Einwirkung von metabolisierenden Mikrosomenfraktionen aus Rattenleber (Ames-Test) eine hohe Korrelation zwischen mutagener und kanzerogener Wirkung für verschiedene Substanzklassen (Tab. 3, McCann et al. 1975).

Substanzklassen	Prozentuale Übereinstimmung	
	von Kanzerogenität mit Mutagenität	von Nicht-Kanzerogenität mit Nicht-Mutagenität
Aromatische Amine	92 %	75 %
Alkylhalogenide	85 %	33 %
Polyzyklische Aromaten	96 %	78 %
Ester, Epoxide, Carbamate usw.	72 %	55 %
Nitroaromaten und Heterozyklen	100 %	25 %
Verschiedene Aliphaten und Aromaten	20 %	85 %
Nitrosamine	95 %	100 %
Verschiedene Stickstoffverbindungen	78 %	75 %
Azofarbstoffe und Diazo-Verbindungen	100 %	67 %

Tab. 3: Übereinstimmung zwischen kanzerogener und mutagener Wirkung bei verschiedenen Substanzklassen im Ames-Test (zusammengestellt nach McCann et al. 1975).

Auch weitere kooperative Studien, in denen auch andere Testsysteme einbezogen wurden, zeigen eine gute Korrelation zwischen mutagener und kanzerogener Wirkung (de Serres 1976, Brookes und de Serres 1976, Sugimura et al. 1976).

Was die Gruppe der PAK betrifft, so waren von insgesamt 124 im Ames-Test geprüften kanzerogenen und nicht kanzerogenen polyzyklischen Kohlenwasserstoffen bis auf zwei Fälle alle kanzerogenen Substanzen auch mutagen. Von den 36 nicht kanzerogenen Substanzen waren 18 mutagen, wobei in Betracht gezogen werden muß, daß fehlende Kanzerogenität ein nur schwer erfaßbares Kriterium darstellt (Tab. 4).

Substanzklasse	kanzerogen mutagen	Anzahl der Verbindungen				Literatur
		+	+	Ø	Ø	
		+	Ø	+	Ø	
Polyzyklische aromatische Kohlenwasser- stoffe		27	0	2	7	McCann et al. 1975
		37	0	7	9	Coombs et al. 1976
		15	2	8	0	Andrews et al. 1978
		7	0	1	2	Purchase et al. 1978
	gesamt	86	2	18	18	

Tab. 4: Korrelation zwischen Kanzerogenität und Mutagenität bei PAK im Ames-Test (+ = kanzerogen bzw. mutagen, Ø = nicht mutagen bzw. nicht kanzerogen).

Bei in vitro-Versuchen an Säugetierzellen (V 79 Zellen des Chinesischen Hamsters) unter Zusatz metabolisierender Leberfraktionen waren die als kanzerogen bekannten PAK – unter ihnen B(a)p – im Gegensatz zu den als nicht kanzerogen geltenden PAK ebenfalls mutagen (Krahn und Heidelberger 1977).

Bei in-vivo-Versuchen konnten von Basler und Röhrborn (1976) in Oozyten der Maus und im Knochenmark des Chinesischen Hamsters Chromosomenaberrationen durch B(a)p nachgewiesen werden. Das schwach kanzerogene Chrysen ließ bei den gleichen zytogenetischen Untersuchungen dagegen nur eine mäßige Mutagenität erkennen (Basler et al. 1977). In Übereinstimmung mit ihrer kanzerogenen Potenz bzw. Inaktivität traten bei 3 Polyzyklen, u.a. B(a)p, Schwesterchromatidaustausche auf (Bayer und Bauknecht 1977).

Die auffallende Parallelität zwischen dem Auftreten von Chromosomenveränderungen und dem Prozeß der malignen Entartung wurde von Levan und Levan (1975) am Beispiel von zwei PAK (B(a)p und Methylcholanthren) direkt im Experiment untersucht. In experimentell induzierten Sarkomen der Ratte fanden sie spezifische Chromosomenveränderungen (Markerchromosomen), deren Auftreten ebenso wie die kanzerogen-induzierte Karyotyp-Variabilität allgemein von der Art und Wirkungsweise des induzierenden Kanzerogens, besonders aber von dessen onkogener Potenz beeinflußt wird.

Auch für durch andere chemische Kanzerogene sowie durch Viren und durch Strahlen experimentell ausgelöste Tumoren ist die Induktion spezifischer Chromosomenanomalien bekannt (Übersicht bei Bartram und Rüdiger 1978).

Bei bestimmten menschlichen Tumoren wurden ebenfalls Chromosomenveränderungen gefunden, die für den jeweiligen Tumor relativ typisch sind. Umgekehrt ließ sich bei Patienten mit bestimmten Erbkranken, die sich unter dem Begriff "Chromosome Breakage Syndroms" zusammenfassen lassen, eine erhöhte Tendenz zu neoplastischen Erkrankungen feststellen. Zudem konnte eine erhöhte Sensitivität von Zellen solcher Patienten gegenüber der Aktivität chemischer Mutagene und Kanzerogene gezeigt werden (Übersichten bei Zankl und Zang 1978, Bartram und Rüdiger 1978).

Neben diesen Befunden legen auch die Ergebnisse von molekular-genetischen Untersuchungen einen engen Zusammenhang zwischen Mutagenität und Kanzerogenität nahe.

Als eine der entscheidenden molekularen Veränderungen, die der Mutations- und Krebsentstehung zugrunde liegen, wird die Reaktion (Komplexbildung) der mutagenen bzw. kanzerogenen Noxe mit der DNS angesehen (Brookes 1977).

Nach Art der Komplexbildung unterscheidet man DNS-Anlagerung und DNS-Einlagerung (Interkalierung) sowie kovalente Bindung mit der DNS (Gebhart 1977 a).

Von den kanzerogenen PAK bzw. ihren aktiven Metaboliten konnte inzwischen die Fähigkeit zur chemischen Reaktion mit der DNS, ebenso wie ihre mutagene Aktivität gesichert werden.

Es zeigte sich, daß verschiedene PAK physikalisch an die DNS angelagert werden können (Lesko et al. 1971) bzw. chemische Komplexe mit ihr bilden (Brookes und Heidelberger 1969).

Außerdem wurde über Interkalierung der PAK berichtet (Ames et al. 1972). Nach Aussage von Wiegrebe (1978) interkaliert B(a)p zwischen jedem 100. bis 1 000. Basenpaar.

Kovalente Bindung von PAK an die DNS der Haut von Mäusen fanden Brookes und Lawely (1964). Sie stellten die Behauptung auf, daß eine metabolische Aktivierung der PAK Voraussetzung für die DNS-Reaktion sei. Unter entsprechender metabolischer Aktivierung ließ sich auch eine kovalente Bindung der B(a)p-Metaboliten an die DNS nachweisen (Gelboin 1969, Harris et al. 1976).

Inzwischen konnte generell festgestellt werden, daß die meisten der bekannten und chemisch zum Teil recht trägen Kanzerogene erst metabolisch in ihre elektrophilen Aktivitätszustände, in die sog. "ultimate carcinogens" überführt werden müssen, ehe sie kovalent an die biologisch wichtigen Moleküle

der Zelle gebunden werden können (Peidelberger 1975). Vermutlich geht dem Schritt der kovalenten Bindung der Schritt der Interkalierung voraus (Sims und Grover 1974).

Miller und Miller (1971) sehen die gemeinsame molekulare Basis mutagener und kanzerogener Wirkung in der Bindung elektrophiler Ionen, die mit nukleophilen Gruppen der Zelle reagieren und damit ihre mutagene und karzinogene Aktivität entfalten. Wenngleich derzeit auch noch keine endgültige Klarheit über die Art des Zusammenhangs zwischen der Reaktion chemischer Kanzerogene mit Nukleinsäuren und der malignen Entartung besteht, so fällt doch auf, daß viele Kanzerogene, sei es direkt oder nach metabolischer Aktivierung, in der Lage sind, mit Nukleinsäuren in gleicher oder ähnlicher Weise zu reagieren, wie dies für chemische Mutagene bekannt ist (Heidelberger 1975, Sugimura 1974).

Die engen, möglicherweise kausalen Zusammenhänge zwischen Mutagenese und Kanzerogenese haben somit für die Mutagenitätsforschung eine neue Dimension eröffnet: Neben der Erfassung potentieller genetischer Risiken für die Nachkommenschaft sind auch allgemeinere Aussagen über die Induktion von somatischen Mutationen und damit über ein von einer mutagenen Substanz ausgehendes potentielles Krebsrisiko möglich geworden. Einfache in-vitro-Mutagenitätstests, kombiniert mit metabolisierenden Leberfraktionen, werden daher im Rahmen eines Vor-Screenings bereits zur Erfassung potentieller Krebsrisiken empfohlen (Bridges 1976), da entsprechende Tierversuche bei der großen Zahl vorhandener und neu entstehender Umweltchemikalien praktisch nicht realisierbar sind.

Die Ergebnisse dürfen aber nicht dahingehend gedeutet werden, daß die betreffenden Verbindungen mit absoluter Sicherheit für Mensch und Tier kanzerogen wirken, denn die gegen-

wärtigen Mutagenitätstests beinhalten die Möglichkeiten falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse. Die größte Korrelation (über 80 %) zwischen mutagener und kanzerogener Eigenschaft wurde mit dem Ames-Test erhalten. Hefen (Eukaryonten) ließen dagegen keine derartige Korrelation erkennen (Übersicht bei Froberg 1978).

Für unsere Mutagenitätstests mit B(a)p und B(a)p-derivaten verwendeten wir Kulturen von *Chlamydomonas reinhardtii*. An diesen Phytoflagellaten wurden erst wenige Substanzen auf eine mutagene Wirkung untersucht, so daß noch keine Aussage über die Korrelation zwischen Kanzerogenität und Mutagenität in diesem Testsystem getroffen werden kann. Außerdem ist nicht bekannt, ob Flagellaten als Eukaryonten – analog den Prokaryonten im Ames-Test – mit Lebermikrosomen kombiniert werden können bzw. zum Nachweis einer mutagenen Wirkung von Kanzerogenen, die metabolische Aktivierung benötigen, geeignet sind. Unsere Untersuchungen wurden trotz dieser Vorbehalte mit *Chlamydomonas reinhardtii* und nicht mit dem Ames-Test durchgeführt, da B(a)p und verschiedene B(a)p-derivate bereits im Ames-Test geprüft wurden. Außerdem besitzt *Chlamydomonas reinhardtii* den Vorteil, daß nicht nur Mutationen im Zellkern, sondern auch in den Plastiden und Mitochondrien erfaßt werden können (Arnold 1971, Schimmer und Werner 1974). Plastiden- und Mitochondrien-DNS zeigen viele Gemeinsamkeiten mit der Bakterien-DNS; sie sind u.a. histonfrei und möglicherweise sogar prokaryontischer Abstammung (Arnold 1971). Somit kann innerhalb dieses Testorganismus die Wirkung mutagener Agenzien auf das eukaryontische Vererbungssystem, aber auch auf das prokaryontische Vererbungssystem der Plastiden und Mitochondrien erfaßt und verglichen werden.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Auftrennung und Charakterisierung der Photo-Oxidationsprodukte von Benzo(a)pyren

1.1. Material

Die Testsubstanz B(a)p wurde von der Fa. Schuchhardt, München bezogen. Die Konzentration (c) der Stammlösung betrug 1 mg/ml Acetonitril. Als Referenzsubstanzen wurden freundlicherweise von Prof. Masuda und Dr. Moriconi B(a)p-3,6-, B(a)p-1,6- und B(a)p-6,12-chinon und von der Fa. Hoechst 7H-Benz(d,e)anthracen-7-on-3,4-dicarbonsäure (B(a)p-säure) zur Verfügung gestellt. Zur Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Aluminiumoxid-Fertigfolien (DC-Alufolie, Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ neutral, Typ E 0,2 mm, Fa. Merck) und Kieselgel-Fertigplatten (Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator, Fa. Merck) verwendet. Als Fließmittel dienten

- 1) Methylenchlorid und

- 2) Hexan, Äther, Propionsäure (10 : 1 : 0,01).

Die Zahlenangaben der Fließmittel beziehen sich auf Volumenprozent. Es wurden Lösungsmittel der Qualität p.a. verwendet. Zur Entwicklung wurden Normalkammern mit Kammersättigung verwendet. Aufgetragen wurde punktförmig mit Mikrocaps 1 µl und streifenförmig mit einer Unimetricspritze 100 µl. Strahlungsquellen waren natürliches Sonnenlicht der Sommermonate, ein Quecksilberhochdruckbrenner der Fa. Phillips mit einer Gesamtleistung von 125 Watt (Wellenlänge max. 366 nm) und Leuchtstofflampen (Radium NL 65 W 32) mit einer Beleuchtungsstärke von 5 000 Lux). Die Absorptionsspektren wurden mit dem UV/VIS Spektralphotometer Varian 635 D gemessen.

1.2. Methode

Das auf DC-Folien bzw. -Platten punktförmig aufgetragene B(a)p (1 µg pro Punkt) wurde jeweils 6 Stunden und länger natürlichem

Sonnenlicht der Sommermonate (hinter Fensterglas), UV-Licht der Wellenlänge 366 nm (Abstand 5 cm) und Weißlicht 5 000 Lux (Abstand 50 cm) ausgesetzt. Die Auftrennung der Photo-Oxidationsprodukte erfolgte dann dünn-schichtchromatographisch. Die gleiche Auftrennung erfolgte auch mit in Acetonitril gelöstem B(a)p ($c = 1 \text{ mg/ml}$) nach 10-tägiger Bestrahlung. Zur Erstellung von Absorptionsspektren wurde streifenförmig (18 cm) aufgetragen und nach Bestrahlung und Entwicklung teilweise mit Methylenchlorid, teilweise mit Methanol nach Abkratzen der Schicht eluiert (Endvolumen ca. 3 ml).

1.3. Versuchsergebnisse

Um den Ergebnissen einen möglichst nahen Praxisbezug zu geben und lösungsmittelbedingte Photo-Oxidationsprodukte auszuschließen, wurde neben in Acetonitril gelöstem B(a)p auch an Al_2O_3 adsorbiertes B(a)p bestrahlt und untersucht. Die Haftfähigkeit ist ein eindeutiges Charakteristikum von B(a)p. Die Fähigkeit von B(a)p, sich an Aktivkohle, kalkhaltigem Material, Kiesel-erde, Glas und Plastik anzureichern, wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Übersicht Adelmann und Suess 1970).

Auf Al_2O_3 adsorbiertes B(a)p konnte nach 6-stündiger Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht, Leuchtstoffröhrenlicht und natürlichem Sonnenlicht – unter Verwendung von Methylenchlorid als Fließmittel – in 5 Fraktionen aufgetrennt werden (Abb. 3). Die Farbintensität war unterschiedlich und am stärksten bei Bestrahlung mit dem leistungsstarken Quecksilberhochdruckbrenner. Auf Kieselgel gelang keine vollständige Trennung der im Tageslicht sichtbaren roten Zone von der darüberliegenden gelben Zone – auch nicht mit anderen Fließmitteln, z.B. Benzol/Aceton 9 : 1, Benzol/Essigester 9 : 1 (Wettig 1964), Benzol/Äther 2 : 1 (Thielemann 1972), Chloroform/Petroläther 9 : 1 (Paalme und Gubergrits 1971). Bis auf die Fraktion der Startzone ließen sich alle Zonen zur Absorptionsmessung mit Chloroform eluieren. Die R_f -Werte und die Absorptionsspektren dieser Zonen entsprachen denen von B(a)p-3,6-chinon, B(a)p-1,6-chinon und B(a)p-6,12-chinon, die

als Referenzsubstanzen vorlagen (Abb. 3 und 4). Diese Chinone entstehen u.a. auch bei der chemischen bzw. elektro-chemischen Oxidation (Cook und Schoental 1950, Raha et al. 1973, Jeftic und Adams 1970), bei der Ozonolyse (Moriconi et al. 1961), bei Chlorierung (Gräf und Nothafft 1963, Reichert 1968) und bei der Metabolisierung (Selkirk et al. 1974) von B(a)p. Auf die schwierige Trennung von 3,6-Chinon und 1,6-Chinon (s.oben) — auch bei Hochdruckflüssigkeitschromatographie — weisen Lorentzen et al. (1975) und Selkirk et al. (1974) hin.

Wie bereits erwähnt, ließ sich die auf Al_2O_3 am Start sitzengebliebene Zone nicht eluieren. Da aufgrund der Aussagen von Tebbens et al. (1971) anzunehmen war, daß es sich hierbei um die Abbauprodukte der Chinone handelt, die auch von Lorentzen et al. (1975) nicht von der Al_2O_3 -Säule eluiert werden konnten, wurden die drei Chinone auf Kieselgel aufgetragen, von dem sie sich nach Bestrahlung und nach Entwicklung mit Methylenchlorid durch Methanol eluieren ließen. Das Absorptionsspektrum des Abbauprodukts von 3,6-Chinon sowie von 1,6-Chinon entsprach dem von B(a)p-säure (Abb. 4). Mit den Säureeigenschaften läßt sich auch das starke Haften dieser Substanz an Al_2O_3 erklären. Das Abbauprodukt von 6,12-Chinon ist unbekannt. Es erwies sich jedoch in Vorversuchen, die im folgenden beschrieben werden, als wenig phototoxisch (s.S. 46).

Bei trocken bestrahltem B(a)p konnte mit dem Fließmittel 2 oberhalb der B(a)p-zone eine weitere sehr schwach grün fluoreszierende Zone beobachtet werden, die in Fließmittel 1 denselben Rf-Wert wie B(a)p besitzt. Ein Absorptionsspektrum konnte wegen der geringen Menge nicht erstellt werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Bis-3,4-benzylpyrenyl (= 6,6'-bi-benzo(a)pyrenyl), das neben Chinonen von Wilk et al. (1966 a) bei der Oxidation von B(a)p mit Jod und von Jeftic und Adams (1970) bei der elektrochemischen Oxidation an Pla-

tinelektroden nachgewiesen wurde und das möglicherweise auch bei Oxidation mit Luftsauerstoff entstehen kann (Wilk et al. 1966 a). Kanzerogenitätsuntersuchungen mit dieser Substanz verliefen negativ (Wilk et al. 1966 b). Die entsprechende Zone auf der Al_2O_3 -Folie zeigte in unserem im folgenden beschriebenen Versuch außerdem keinerlei phototoxische Aktivität (s.S. 40), so daß auf eine eigene Herstellung dieser Substanz und weitere Untersuchungen damit verzichtet wurde.

Bei über mehrere Wochen bestrahltem B(a)p in Acetonitril, einem inerten Lösungsmittel, konnten ebenfalls die drei Chinone und B(a)p-säure nachgewiesen werden. Zusätzlich war unterhalb der B(a)p-zone eine weitere violette Zone schwach zu erkennen. Ein UV-Spektrum ließ sich auch davon nicht erstellen. Auf noch nicht identifizierte, mengenmäßig nicht relevante Photo-Oxidationsprodukte weisen auch andere Autoren hin (Tebbens et al. 1970, Masuda und Karatsune 1966, Mailath et al. 1975).

Eine Zone entsprechend der von B(a)p-4,5-oxid (s.S. 57) konnte nicht beobachtet werden. B(a)p-4,5-oxid — ein starkes Mutagen, das bei der Metabolisierung von B(a)p entsteht und das theoretisch auch bei der Photo-Oxidation von B(a)p entstehen könnte — kann somit ausgeschlossen werden.

Entsprechend der Angaben von Tebbens et al. (1971), die die lichtbedingten Abbauprodukte von B(a)p im Umweltstaub untersuchten, entstehen also aus B(a)p durch Photo-Oxidation als Hauptabbauprodukte B(a)p-3,6-chinon, B(a)p-6,12-chinon, B(a)p-1,6-chinon und B(a)p-säure (Abb. 5), die als Schlüsselsubstanzen gelten und mit denen wir unsere Phototoxizitäts- und Mutagenitätsuntersuchungen durchführten.

Außerdem wurden quantitative Untersuchungen zur Lichtempfind-

lichkeit der B(a)p-chinone durchgeführt, da sich diese Substanzen in unseren Phototoxizitätsprüfungen (s. S. 40) als die phototoxischen Komponenten der B(a)p-abbauprodukte erwiesen haben. In der Literatur finden sich zur Abbaugeschwindigkeit der B(a)p-chinone unter Lichteinfluß keine Angaben. Quantitative Untersuchungen zur Menge der bei der Photo-Oxidation und chemischen Oxidation aus B(a)p entstehenden Chinone wurden bereits durchgeführt (Tebbens et al. 1971, Jeftic und Adams 1970).

Rf-Werte	Farben der Zonen			Referenzsubstanzen	
	im Tageslicht	im langwelligen UV-Licht	im kurzwelligen UV-Licht		
	Front				
0,79		grün-violette Fluoreszenz	Fluoreszenzlöschung	B(a)p	
0,59	hellgelb	schwach braun	"	B(a)p-6,12-chinon	
0,48	gelb	schwach braun	"	B(a)p-1,6-chinon	
0,40	rot	rot	"	B(a)p-3,6-chinon	
0	Start	braun	grüne Fluoreszenz	"	B(a)p-säure

Abb. 3: Photo-Oxidationsprodukte von B(a)p nach 6-stündiger Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) auf Al_2O_3 .
(Fließmittel: Methylenchlorid)

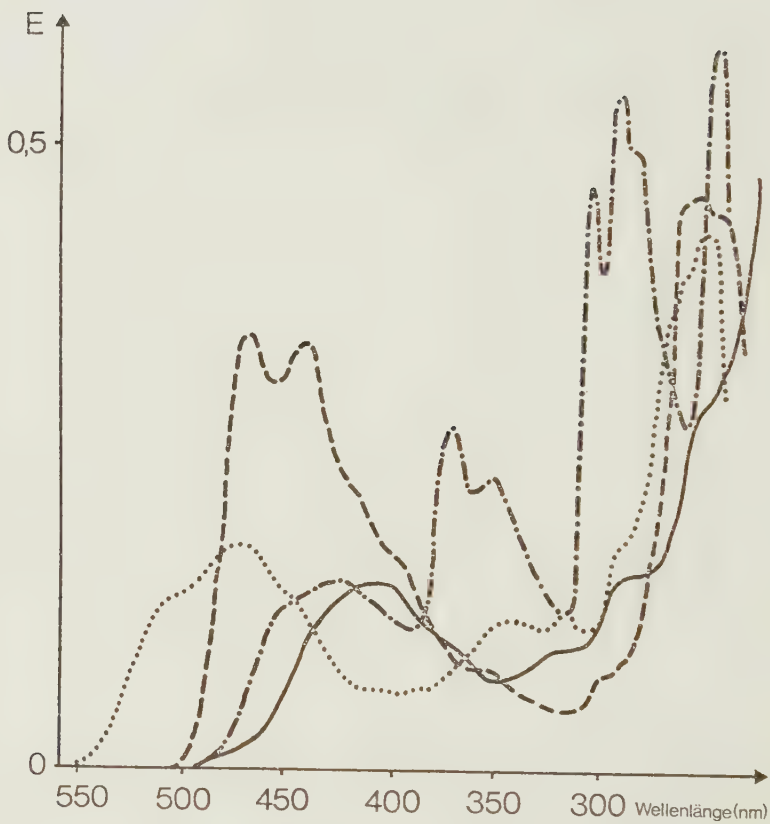


Abb. 4: Absorptionsspektren von
Benzo(a)pyren-3,6-chinon
Benzo(a)pyren-1,6-chinon - - - - -
Benzo(a)pyren-6,12-chinon - · - · -
(Lösungsmittel: Chloroform)
und Benzo(a)pyrensäure —————
(Lösungsmittel: Methanol)

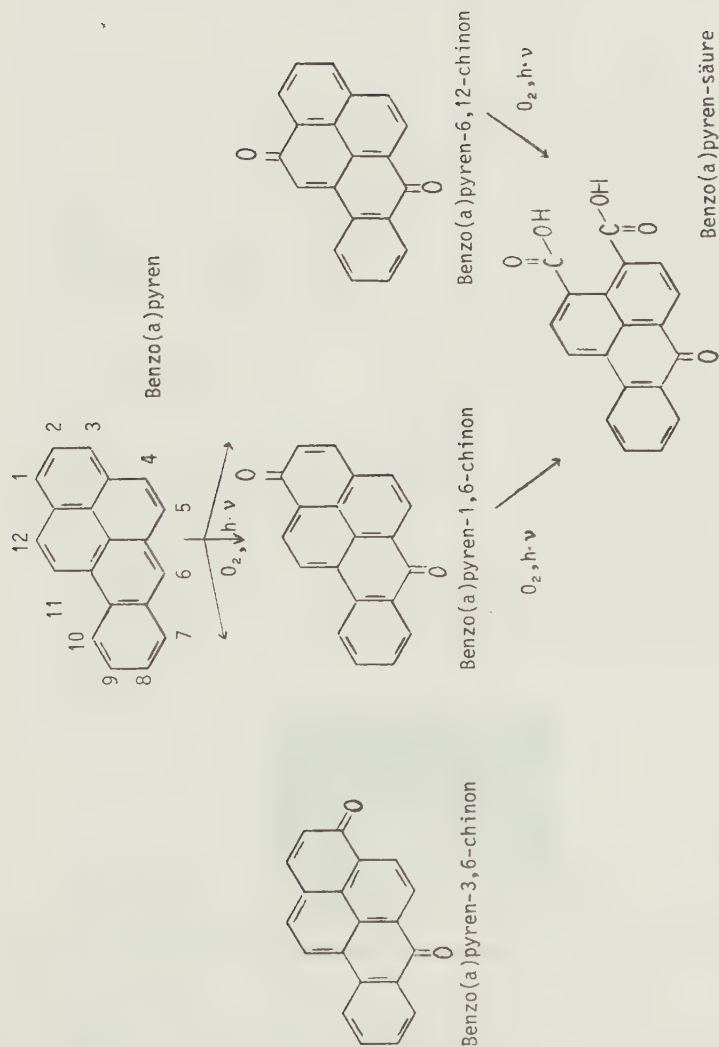


Abb. 5: Bekannte Photo-Oxidations-Produkte von Benzo(a)pyren

2. Quantitative Untersuchungen zur Stabilität bzw. Lichtempfindlichkeit von B(a)p und B(a)p-chinonen durch spektralphotometrische Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen

2.1. Material

Es wurden Lösungen von B(a)p ($126 \mu\text{g/ml} = 0,5 \text{ mmolar}$), B(a)p-1,6-chinon, B(a)p-6,12-chinon und B(a)p-3,6-chinon in Chloroform ($141 \mu\text{g/ml} = 0,5 \text{ mmolar}$) hergestellt. Für die Dünnschichtchromatographie wurden HPTLC-Fertigplatten (Kieselgel 60, F_{254} , $10 \times 20 \text{ cm}$ und RP-18 F_{254} , $10 \times 10 \text{ cm}$) der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Als Fließmittel dienten Chloroform/Aceton (80 : 20) für die Kieselgelplatten und Isopropylalkohol/ H_2O (95 : 5) für die RP-Platten. Der Reinheitsgrad der Reagenzien war p.a..

Die HPTLC-Kieselgelplatten ließen wir zur Vermeidung einer Schmutzfront in dem entsprechenden Fließmittel vorlaufen. Zur Bestrahlung wurde der Camag-Reprostar (29305/29307) verwendet, bei dem mit vier UV-Leuchtkörpern der Wellenlänge 366 nm (Silvania-Fluoreszenzröhre F8 T5), zwei UV-Leuchtkörpern der Wellenlänge 254 nm (Silvania Hg-Röhre) oder mit vier Leuchtstoffröhren (Osram L, 8 W/25, Universal-Weiß) belichtet werden konnte. Die spektrale Strahlungsverteilung dieser Leuchtstoffröhren ist in Abbildung 6 wiedergegeben.

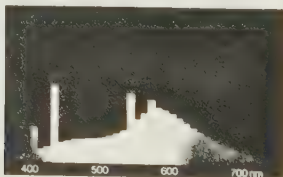


Abb. 6: Spektrale Strahlungsverteilung der Osram-Leuchtstoffröhre Universal-Weiß, Lichtfarbe 25, bezogen auf 1000 lm in $\text{mW}/10 \text{ nm}$.
 Bildhöhe entspricht $\frac{400 \text{ mW}}{1000 \text{ lm} \cdot 10 \text{ nm}}$ (Angaben des Herstellers).

Der mittlere Abstand der Leuchtstoffkörper von der Platte betrug ca. 15 cm. Die Beleuchtungsstärke, der die Prüfsubstanzen ausgesetzt wurden, betrug bei Bestrahlung mit den Leuchtstoffröhren 3 000 Lux, bei Bestrahlung mit den UV-Leuchtstoffen (366 nm) 170 Lux und bei Bestrahlung mit den UV-Leuchtstoffen (254 nm) 6 Lux. Die Beleuchtungsstärken wurden von der Fa. Siemens, Nürnberg, mit einem Raumbeleuchtungsmesser bestimmt. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten mit einem rechnergesteuerten Auswertesystem mit folgendem apparativen Aufbau: DC-Spektralphotometer Zeiss PM Q II, ausgerüstet mit Schrittmotoren für den Koordinatentisch in x- und y-Richtung, Digitalvoltmeter HP 3470, Tischrechner HP 9830 mit BCD- und A SCII-I/O-Interface und Steuergerät.

2.2. Methode

Jeweils 1 µl äquimolarer Lösungen von B(a)p bzw. B(a)p-chinonen wurden mit Mikrocaps auf HPTLC-Platten (im Abstand von 9 mm und 15 mm vom unteren Rand entfernt) in den weiter unten angegebenen Zeitabständen aufgetragen und 1 - 65 Stunden verschiedenen Lichtquellen, wie Leuchtstoffröhrenlicht, lang- und kurzwelligem UV-Licht ausgesetzt. Nach Beendigung der Bestrahlung wurde der Standard (S) zwischen die Probeflecken (P) aufgetragen. Der Auftragemodus pro 2 RP-Platten bzw. einer Kieselgelplatte entsprach folgendem Schema:

P_1 S P_2 P_1 S P_2 P_3 S P_4 P_3 S P_4 P_5 S P_6 P_5 S P_6 ,
wobei

P_1 P_2 P_3 P_4 P_5 und P_6

die Probeflecken darstellen, die 66, 46, 20, 5, 2 und 1 Stunde vor Beendigung der Bestrahlung aufgetragen wurden.

Zur Bestimmung der linearen Regression wurden 4 verschiedene Standardkonzentrationen jeweils auf eine Platte aufgetragen.

Die Platten wurden in Normalkammern mit Kammersättigung mit den entsprechenden Laufmitteln (Laufhöhe etwa 4 cm) entwickelt, wodurch die Abbauprodukte von der unzerstörten Substanz abgetrennt wurden. Nach kurzem Trocknen der Platten im kalten Luftstrom wurde die unzerstörte Substanz direkt auf der Platte über Fluoreszenzmessung bestimmt.

Die Meßbedingungen waren entsprechend den Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Substanzen verschieden:

<u>B(a)p:</u>	<u>B(a)p-1,6-chinon:</u>
Anregungswellenlänge 366 nm	Anregungswellenlänge 436 nm
Monochromatfilter M 436	Monochromatfilter M 546
Spalt 1,0 x 6 mm	Spalt 1,5 x 6 mm
Verstärkung 1/5/III/A	Verstärkung 10/10/III/A
<u>B(a)p-3,6-chinon:</u>	<u>B(a)p-6,12-chinon:</u>
Anregungswellenlänge 436 nm	Anregungswellenlänge 366 nm
Sperrfilter F1 56 ($\approx$ 560 nm)	Monochromatfilter M 546
Spalt 1,5 x 6 mm	Spalt 2 x 6 mm
Verstärkung 10/10/III/A	Verstärkung 10/10/III/A

Die Auswertung erfolgte automatisch — gesteuert über einen Tischrechner — mit dem Programm für die Auswertart der integrierten Fläche mit Basislinienkorrektur (Ebel und Hocke 1977, Böhler und Schmidt 1979).

Meßprinzip

Jeder einzelne Fleck wird positioniert, indem der Rechner aufgrund des Meßsignals den Koordinatentisch steuert.

Meßvorgang

Man stellt die Platte auf die erste Meßbahn unterhalb des zu messenden Flecks ein. Dem Rechner werden Bahnabstand, Anzahl der Bahnen und die Schrittgrößen für Positionierung und Messung vorgegeben und dann die automatische Auswertung gestartet.

Neben der Meßgröße (Fläche) werden zur Kontrolle Peakmaximum, Basiswert vor und nach dem Peak und die jeweils gemessene Bahn ausgedruckt. Zusätzlich lief ein Schreiber während des Rücklaufs auf der gemessenen Bahn mit. Die Flächenänderungen der Proben gegenüber den Standards werden in % berechnet und ausgedruckt.

2.3. Ergebnisse

Da die B(a)p-chinone eine rote bzw. gelb-rote Fluoreszenz unter UV-Licht (366 nm) aufweisen, können quantitative Bestimmungen dieser Substanzen durch Messung der Fluoreszenzintensität auf Dünnschichtplatten – bezogen auf einen externen Standard – durchgeführt werden. Diese Methode bietet folgenden Vorteil: einfache dünnschichtchromatographische Abtrennung der fluoreszierenden Abbauprodukte der Chinone und sofortige quantitative Bestimmung der Chinone in einem Arbeitsgang. Demgegenüber ist die quantitative Bestimmung der Chinone durch Messung der UV-Absorptionskurven, wie von Tebbens et al. (1971) beschrieben, aufgrund des erforderlichen Eluierens der Substanz von der Dünnschichtplatte (Abkratzen, Lösen der Chinone in Methylenchlorid, Filtration) und zweimaligen Waschens mit Benzol relativ zeitraubender und möglicherweise ungenauer. Die automatische rechnergesteuerte Auswertung des Dünnschichtchromatogramms bringt zusätzlich einen Gewinn an Genauigkeit und an Zeit, da die optimale Positionierung aller Bahnen und Flecke im Meßspalt von Hand entfällt. Für die Dünnschichtchromatographie wurden HPTLC-Platten verwendet, die im Gegensatz zu den "normalen" Dünnschichtplatten den Vorteil haben, daß mit geringeren Mengen gearbeitet werden kann und sehr kleine, scharf umrissene Flecken entstehen, die gut meßbar sind. Die Anzahl der Test- und Standardflecken pro Platte kann dadurch erhöht werden. Außerdem bieten diese Platten bessere Trennung bei

kürzeren Entwicklungszeiten (Schwedt 1979).

Schwierigkeiten bereitete in unserem Fall die vollständige Abtrennung der unveränderten Prüfsubstanzen von ihren Abbauprodukten. Gute Ergebnisse brachten HPTLC-Kieselgel-Platten mit Chloroform/Aceton (80 : 20) und HPTLC-RP-Platten (RP = reversed phase) mit Isopropylalkohol/H₂O (95 : 5) als Fließmittel. Die HPTLC-RP-Platten waren besonders gut geeignet zur Bestimmung des B(a)p. Aufgrund des reversed-phase-Systems hat das unpolare B(a)p hier einen niedrigeren R_f-Wert als die polaren Abbauprodukte. Die Abbauprodukte werden gut nach oben abgetrennt und B(a)p bildet scharf umrandete, gut meßbare Flecken. Auf den Kieselgel-Platten liegt B(a)p unterhalb der Laufront. Die Platten mußte man vorlaufen lassen, da sonst eine Schmutzfront die Ergebnisse verfälschte. Die Chinone ließen sich dagegen besser auf diesem Plattentyp bestimmen, da auf RP-Platten leichte Schwanzbildung zu sehen war.

Die Lichtempfindlichkeit bzw. Abnahme der Fluoreszenzintensität von B(a)p und B(a)p-chinonen auf HPTLC-Kieselgel- und RP-Platten unter Einfluß von UV 366, UV 254 und sichtbarem Licht ist in den Tabellen 5 bis 10 wiedergegeben. Die Linearität der Eichgerade ist mit 95 % Wahrscheinlichkeit gesichert (Tab.11,12). Wie ersichtlich, sind die Chinone keinesfalls stabil, wie z.B. Lorentzen et al. (1975) schreiben, sondern lichtempfindlich, wenn auch nicht in dem Maße wie B(a)p.

Betrachtet man das auf HPTLC-RP-Platten aufgetragene B(a)p, so ist es nach 20-stündiger Bestrahlung mit lang- und kurzwelligem sowie sichtbarem Licht nicht mehr nachweisbar. Von den Chinonen sind nach dieser Zeit noch 30 bis 80 % vorhanden, und zwar in Abhängigkeit von der Art des Chinons und der Lichtquelle. B(a)p-6,12-chinon wird bei langwelligem UV-Licht am schnellsten abgebaut. Nach 44 Stunden ist es nicht mehr

nachweisbar, während von B(a)p-3,6-chinon und B(a)p-1,6-chinon noch über 60 % gefunden werden (Tab. 5). Bei kurzwelligem UV-Licht wird 6,12-chinon ebenfalls etwas schneller abgebaut als die übrigen Chinone, aber nicht in dem Maße wie bei langwelligem UV-Licht. Nach 66 Stunden werden von 6,12-Chinon noch 60 bzw. 65 % gefunden (Tab. 7). Bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht ist das 3,6-Chinon am stabilsten. Nach 66 Stunden sind davon noch ca. 50 % nachweisbar, während von 1,6- und 6,12-Chinon nur noch ca. 30 bzw. 20 % gefunden werden (Tab. 9).

Die unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten der einzelnen Chinone durch langwelliges, kurzwelliges und sichtbares Licht wird erklärlich, wenn man die Maxima der entsprechenden Absorptionsspektren (s.S. 24) betrachtet, denn nur Licht, das von einer Substanz absorbiert wird, ist photochemisch wirksam (Aretz 1975). B(a)p-6,12-chinon z.B. zeigt starke Absorption im Wellenbereich um 366 nm und wird somit durch langwelliges UV-Licht wesentlich schneller abgebaut als die anderen Chinone.

Überraschend war zunächst die Tatsache, daß die auf RP-Platten bestrahlten Substanzen schneller abgebaut wurden als die auf Kieselgel-Platten. RP-Platten besitzen eine desaktivierte Schicht, wodurch photochemische Reaktionen von lichtempfindlichen Substanzen verringert werden sollen (Seifert 1977). Da jedoch die Fleckenausbreitung auf den RP-Platten größer als auf Kieselgel-Platten ist, und somit eine größere Substanzfläche dem Licht ausgesetzt war, werden die Ergebnisse erklärlich.

Fluoreszenzintensität in %, bezogen auf die nicht bestrahlte Substanz (jeweils 2

Bestrahlungsdauer (Stunden)	Meßwerte)				
	B(a)p	B(a)p-3,6-chinon	B(a)p-1,6-chinon	B(a)p-6,12-chinon	
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	61.7	98.1	98.7	98.9	99.5
2	48.2	96.2	97.3	96.2	94.3
5	13.4	94.2	95.5	93.4	88.1
20		80.6	83.5	81.5	34.7
44		66.1	66.9	62.6	64.3
66		48.7	51.4	53.8	54.5

Tab. 5: Abnahme der Fluoreszenzintensität von B(a)p und B(a)p-chinonen nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm) auf HPTCL-RP-Platten

Fluoreszenzintensität in %, bezogen auf die nicht bestrahlte Substanz (jeweils zwei Meßwerte)

Bestrahlungsdauer (Stunden)	B(a)p	B(a)p-3,6-chinon	B(a)p-1,6-chinon	B(a)p-6,12-chinon
0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	77.0	99.5	99.1	99.0
2	65.4	98.9	99.0	98.1
5	42.6	95.8	96.2	95.3
20		93.3	92.0	86.8
44		85.7	86.2	76.2
66		76.6	76.9	63.8

Tab. 6: Abnahme der Fluoreszenzintensität von B(a)p und B(a)p-chinonen nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm) auf HPTCL-Kieselgel-Platten

Fluoreszenzintensität in %, bezogen auf die nicht bestrahlte Substanz (jeweils zwei

Bestrahlungsdauer (Stunden)	Meßwerte)				
	B(a)p	B(a)p-3,6-chinon	B(a)p-1,6-chinon	B(a)p-6,12-chinon	
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	67.1	68.5	98.7	99.3	97.8
2	50.7	50.0	94.8	96.3	94.5
5	24.8	28.0	91.4	93.1	86.3
20			74.1	82.2	61.8
44			67.6	70.8	53.1
66			60.8	65.6	44.5
					42.1

Tab. 7: Abnahme der Fluoreszenzintensität von B(a)p und B(a)p-chinonen nach Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) auf HPTLC-RP-Platten

Fluoreszenzintensität in %, bezogen auf die nicht bestrahlte Substanz (jeweils zwei Meßwerte)

Bestrahlungsdauer (Stunden)	B(a)p	B(a)p-3,6-chinon	B(a)p-1,6-chinon	B(a)p-6,12-chinon
0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	84.4	83.7	99.0	97.2
2	70.4	71.4	98.2	94.1
5	46.8	46.5	90.1	90.3
20	9.9	81.6	80.5	84.9
44		76.5	77.1	78.5
66		72.4	74.8	75.6

Tab. 8: Abnahme der Fluoreszenzintensität von B(a)p und B(a)p-chinonen nach Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) auf HPTLC-Kieselgel-Platten

Fluoreszenzintensität in %, bezogen auf die nicht bestrahlte Substanz (jeweils zwei Meßwerte)

Bestrahlungsdauer (Stunden)	B(a)p	B(a)p-3,6-chinon	B(a)p-1,6-chinon	B(a)p-6,12-chinon
0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	70.96	98.0	98.7	95.3
2	56.68	96.4	97.8	93.2
5	19.22	94.1	94.5	86.5
20		75.5	76.1	65.5
44		59.3	58.4	35.5
66		52.5	50.3	29.0

Tab. 9: Abnahme der Fluoreszenzintensität von B(a)p und B(a)p-chinonen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht (Leuchtstoffröhrenlicht) auf HPTLC-RP-Platten

Fluoreszenzintensität in %, bezogen auf die nicht bestrahlte Substanz (jeweils zwei Meßwerte)

Bestrahlungsdauer (Stunden)	B(a)p	B(a)p-3,6-chinon	B(a)p-1,6-chinon	B(a)p-6,12-chinon
0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	89.0	99.2	99.5	99.4
2	78.4	99.0	98.1	99.1
5	53.0	98.2	97.0	96.4
20	12.1	94.5	91.3	90.6
44		88.6	83.4	81.3
66		84.5	78.5	74.2

Tab. 10: Abnahme der Fluoreszenzintensität von B(a)p und B(a)p-chinonen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht (Leuchtstoffröhrenlicht) auf HPTLC-Kieselgel-Platten

Substanz	x = Meßgröße (Fläche, int. kor.)	y = Substanzmenge pro Fleck in ng	Korrelation	Linearitätstest
B(a)p	2230.6 4060.9 5628.9 7519.9	31.5 63.0 94.5 126.0	$R(x,y) = 0.99937$	$F(\text{Tab. } 95\%) = 18.51$ Linearität statistisch gesichert mit 95% Wahrscheinlichkeit
B(a)p- 3,6-chinon	1172.4 1990.0 2706.0 3081.4	35.25 70.50 105.75 141.00	$R(x,y) = 0.98776$	$F(\text{Tab. } 95\%) = 18.51$ Linearität statistisch gesichert mit 95% Wahrscheinlichkeit
B(a)p- 1,6-chinon	1448.4 2229.6 2921.5 3582.0	35.25 70.50 105.75 141.00	$R(x,y) = 0.99924$	$F(\text{Tab. } 95\%) = 18.51$ Linearität statistisch gesichert mit 95% Wahrscheinlichkeit
B(a)p- 6,12-chinon	545.1 899.9 1189.0 1565.7	35.25 70.50 105.75 141.00	$R(x,y) = 0.99885$	$F(\text{Tab. } 95\%) = 18.51$ Linearität statistisch gesichert mit 95% Wahrscheinlichkeit

Tab. 11: Lineare Regression von B(a)p und B(a)p-chinonen auf HPTLC-RP-Platten

Substanz	X = Meßgröße (Fläche, int. korr.)	Y = Substanzmenge pro Fleck in ng	Korrelation	Linearitätstest
B(a)p	799.20 1624.60 2460.00 3184.00	31.50 63.00 94.50 126.00	$R(X,Y) = 0.99948$	$F(\text{Tab. } 95\%) = 18.51$ Linearität statistisch gesichert mit 95% Wahr- scheinlichkeit
B(a)p- 3,6-chinon	993.70 1843.90 2814.90 3581.40	35.25 70.50 105.75 141.00	$R(X,Y) = 0.99908$	$F(\text{Tab. } 95\%) = 18.51$ Linearität statistisch gesichert mit 95% Wahr- scheinlichkeit
B(a)p- 1,6-chinon	1288.60 2195.40 2939.60 3682.20	35.25 70.50 105.75 141.00	$R(X,Y) = 0.99872$	$F(\text{Tab. } 95\%) = 18.51$ Linearität statistisch gesichert mit 95% Wahr- scheinlichkeit
B(a)p- 6,12-chinon	422.20 765.00 1063.70 1340.00	35.25 70.50 105.75 141.00	$R(X,Y) = 0.99879$	$F(\text{Tab. } 95\%) = 18.51$ Linearität statistisch gesichert mit 95% Wahr- scheinlichkeit

Tab. 12: Lineare Regression von B(a)p und B(a)p-chinonen auf HPTLC-Kieselgel-Platten

3. Phototoxizitätsuntersuchungen an Tetrahymena pyriformis

3.1. Material

Zur Darstellung und Bewertung phototoxischer Schädigung wurden Ciliaten der Art *Tetrahymena pyriformis* herangezogen, die sich durch leichte Kultivierbarkeit in bakterienfreien Nährmedien, rasche Zellvermehrung sowie nach Kidder und Dewey (1951) ein der Säugetierzelle vergleichbares Enzymsystem auszeichnen. Sie nehmen laufend einen Teil der sie umgebenden Flüssigkeit samt darin suspendierter Partikel phagozytär auf. Auf diesem Wege können auch an Feststoffe gebundene Substanzen ihre Wirkung innerhalb der Zelle entfalten. Ihre phototoxische Empfindlichkeit gegenüber PAK entspricht etwa der menschlichen Zelle *in vitro* (Bauer 1977).

Medium

Die Ciliaten wurden in einem flüssigen Medium folgender Zusammensetzung (Bauer 1978) kultiviert:

Tryptic Soy Broth Difco (0 370-01) : 10 g

Tryptine, Difco (0 123-01) : 10 g

Aqua dest.: 1 l

pH-Einstellung erübrigte sich.

Die Stammkulturen wurden wöchentlich zweimal überimpft, so daß stets Ciliaten in der Logphase des Kulturwachstums zur Verfügung standen.

Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden neben den bereits beschriebenen Substanzen B(a)p und B(a)p-säure (S. 18), selbst hergestellte Chione verwendet, da diese nur in geringen Mengen als Referenzsubstanzen zur Verfügung gestellt wurden.

Die Herstellung erfolgte nach einer Vorschrift von Vollmann et al. (1937):

0,17 g B(a)p wurden in 3,4 ml heißem Eisessig gelöst und durch rasches Abkühlen in feiner Verteilung wieder abgeschieden. Nach Einrühren einer Lösung von 0,22 g Chromsäure in 0,5 ml Wasser wurde langsam bis zum Sieden erhitzt, wobei völlige Lösung erfolgte. Raha et al. (1937) konnten nachweisen, daß aus der Lösung nicht nur zwei Chinone (5.10, 5.8 = 1.6, 3.6), wie Vollmann et al. (1937) annahmen, sondern drei Chinone (1.6, 3.6 und 6.12) auskristallisieren. Eine Trennung des Chinongemisches ist durch Säulenchromatographie mit Al_2O_3 (Antonella und Carlassare 1964) und auf Al_2O_3 - Platten mit Benzol/Äthanol (99 : 1) (Lorentzen et al. 1975) möglich.

Wir trennten dieses Chinongemisch auf Al_2O_3 -Dickschichtplatten (Fa. Merck) mit Methylenchlorid als Laufmittel.

Die einzelnen Chinone wurden mit Chloroform eluiert. Absorptionsspektren waren mit denen der Literatur (Lorentzen et al. 1975) und denen der Referenz-Substanzen identisch.

3.2. Methode

Die phototoxische Aktivität der Testsubstanzen wurde in Ciliatenlichttests

1. durch mikroskopische Bestimmung der zeitlichen Absterberate nach Bauer und Gräf (1976) und
2. durch photometrische Trübungsmessung nach Gräf und Haller (1977)

ermittelt.

3.2.1. Mikroskopische Bestimmungen

Die zeitliche Absterberate der Ciliaten unter Schadstoffeinwirkung wurde im Tropfenversuch in einer als "feuchte Kammer" modifizierten Plastik-Petrischale bestimmt. Hierbei werden je 10 μ l reine sowie mit acetonischer Testlösung versetzte Ciliatenkultur mit einer sterilen Einmalspritze (Hamilton-Spritze) tropfenförmig auf die Innenseite einer sterilen Einweg-Plastikpetriscchale gebracht, und zwar in das offene Feld einer innen anliegenden, rechteckig ausgeschnittenen und angefeuchteten Filtrierscheibe (Abb. 7).

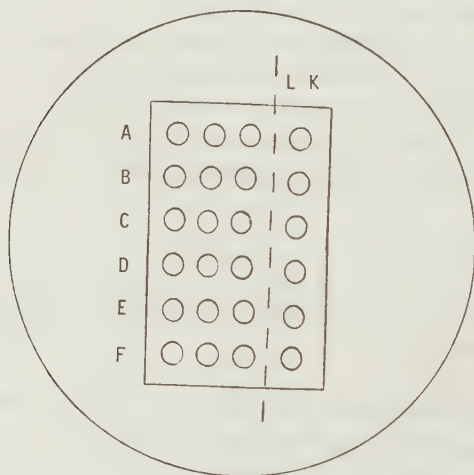


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Plastikpetriscchale zur Ermittlung der phototoxischen Zellschäden (Aufsicht). Die Tropfen mit den Ciliaten und den zu prüfenden Substanzen sind im offenen Feld einer innen anliegenden, rechteckig ausgeschnittenen und angefeuchteten Filtrierscheibe zusammengefaßt (LK = Leerkontrolle = reine Ciliatenkultur, A = B(a)p, B = B(a)p-3,6-chinon, C = B(a)p-1,6-chinon, D = B(a)p-6,12-chinon, E = B(a)p-säure, F = Lösungsmittel = Aceton).

Die Filtrierpapierscheibe verhindert ein Verdunsten der Tropfen, so daß die Einzeller in solchen Tropfenkulturen mehrere Stunden bis Tage am Leben bleiben können. In jedem Tropfen befanden sich jeweils 20 - 30 Ciliaten. Die Konzentration des Lösungsmittels für die Testsubstanzen lag bei 0,05 %. In dieser Konzentration hatte Aceton keinen nachteiligen Einfluß auf die Einzeller. Die Tropfenkulturen wurden im Abstand von 15 cm mit einer Tischlampen-Leuchtstoffröhre Osram-L, W 16/25 Universal-Weiß bestrahlt. Die Lichtintensität am Ort der Testorganismen betrug unter Berücksichtigung eines 10 % Intensitätsverlustes durch den Petrischalendeckel ca. $54 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, entsprechend einer Beleuchtungsstärke von 5 400 Lux.

Bei Lichteinwirkung macht sich die phototoxische Wirksamkeit einer Substanz durch zunehmende Änderungen des Bewegungsverhaltens und der Zellmorphologie der Ciliaten (Verlangsamung der Beweglichkeit, Immobilisierung, Abrundung der Zellen und Vakuolenbildung) und deren schließliches Zerplatzen bemerkbar (Abb. 8).

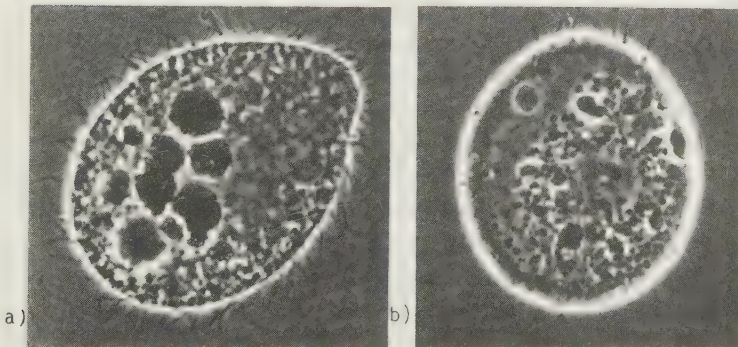


Abb. 8: Morphologie von *Tetrahymena pyriformis* unter phototoxischer Schädigung

- a) Beginnende Vakuolenbildung und Abrundung der Zellen
- b) Massive vakuolige Degeneration der völlig abgerundeten und aufgeblähten Zellen, unmittelbar vor dem Zerplatzen, Vergrößerung 1 : 1000

Eine zweite Petrischale mit dem gleichen Versuchsansatz wurde im Dunkeln aufbewahrt, um so den Einfluß der Belichtung auf die Vitalität der Ciliaten durch Dunkelkontrollen vergleichend beobachten zu können.

Als Maß für die phototoxische Schädigung wurde die Zeit genommen, nach der 90 % der Einzeller durch Verlust ihrer Motilität, Abrundung und Vakuolisierung eine irreversible letale Schädigung unter dem Mikroskop (40fache Vergrößerung) erkennen ließen. Daß das Symptom einer völligen Immobilisierung der Zellen eine irreversible letale Schädigung bedeutet, konnte von Bauer (1977) durch sofortiges Einbringen der Einzeller in schadstofffreie Medien und Dunkelhaltung nachgewiesen werden.

3.2.2. Photometrische Trübungsmessungen

Folgende von Gräf und Haller (1977) standardisierte Versuchsanordnung wurde zur photometrischen Bestimmung der phototoxischen Schädigung angewendet:

Benutzt wurden Glaskulturröhrchen (Länge: 16,5 cm, Querschnittsfläche: $1,4 \text{ cm}^2$, Wandstärke: 1 mm), die mit 7 ml der oben beschriebenen Nährlösung steril beschickt wurden. Die zu prüfenden Substanzen wurden in acetonischer Lösung zu je 0,05 ml entsprechender Konzentration zugesetzt. Die Versuchsansätze wurden mit je 3 ml einer gemäß der Zellzahl genormten Ciliatenkultur auf jeweils 10 ml Gesamtvolumen gebracht. Die Acetonmenge von 0,05 ml ad 10 ml Kulturflüssigkeit übt keine wesentliche wachstumshemmende Wirkung auf die Ciliatenkultur aus. Im übrigen wurde dieser Acetonzusatz bei allen Kontrollkulturansätzen gleichermaßen vorgenommen. Die genormte Ciliatenkultur wurde aus einer 7-10-tägigen Stammkultur hergestellt und durch photometrische Trübungsmessungen kontrolliert. Zur Anwendung kamen Kulturen, die unter Filtereinsatz Elko II (Leitz) S 57/E 52 eine Extinktion im Bereich von 0,030 und

0,050 aufwiesen.

Die Lichtexposition der Kulturröhrchen erfolgte in Schräglage bei einem Neigungswinkel von 5° . Dies war notwendig, um einerseits durch optimale Sauerstoffversorgung – große Oberfläche der Kulturflüssigkeit – ein möglichst starkes Kulturwachstum der strikt aeroben Ciliaten zu gewährleisten und andererseits eine maximale Lichtexposition zu bewirken. Diese Belichtung erfolgte in einem Lichtkasten. Die auf einer Glasplatte deponierten Röhrchen wurden von oben und unten gleichzeitig durch zwei Leuchtstoffröhren (Osram L-40 W/25) belichtet. Der jeweilige Abstand zu den Kulturröhrchen betrug 31 cm bzw. 21 cm, so daß die Kulturen einer Lichtintensität von $45 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ausgesetzt waren. Dies entsprach einer Beleuchtungsstärke von 4 500 Lux. Ein gegebenenfalls aufgetretener phototoxischer Effekt macht sich je nach Konzentration und Wirksamkeit der Testsubstanzen durch ein mehr oder minder starkes Absterben bzw. eine Wachstumsminde- rung des Kulturansatzes bemerkbar. Visuell zeigen sich diese Effekte durch unterschiedliche Trübungsgrade im oberen Bereich der Kulturflüssigkeit bzw. durch deutlich sichtbare Detritusbildung in der Röhrchenkuppe.

Die Objektivierung und Standardisierung des Versuchsergebnisses erfolgte in der Weise, daß nach einer ununterbrochenen Belichtungsdauer von 48 Stunden die Testkulturen aus dem Lichtkasten entnommen und in einen Reagenzglasständer gestellt wurden. Es wurde nun abgewartet, bis der aufgewirbelte Detritus der vorher schräg gelagerten Kulturgläser sich wieder sedimentiert hat. Die Trennung von lebenden und toten Zellen wird durch das Bestreben der O_2 -aviden Ciliaten unterstützt, sich an der Oberfläche des Kulturmediums anzureichern. Eine ausreichende Trennung war in 1 - 2 Stunden erreicht. Danach wurden die oberen 5 ml des Kulturansatzes vorsichtig abpipettiert und in ein sauberes Reagenzglas übertragen. Dort wurden die lebenden Ciliaten mit 10 %-iger Formalinlösung fixiert und anschließend photometrisch gemessen. Dazu diente das Photometer

Elko II (Fa. Leitz) mit Filtereinsatz S 57/E 52. Die verwendete Küvette besitzt eine Schichtdicke von 0,995 cm. Besonders zu beachten ist, daß keine Luftblasen in der Meßlösung entstehen, und daß die Ciliaten keine Eigenbewegung mehr aufweisen. Beides stört den Meßvorgang entscheidend.

3.3. Versuchsergebnisse

Da die Einzeller auch Festpartikel mit darauf haftenden Substanzen innerhalb weniger Minuten phagozytär über den Strudelmechanismus des Cystostoms aufnehmen, wurden zunächst qualitative Vorversuche mit den auf Aluminiumoxid aufgetrennten B(a)p-Abbauprodukten durchgeführt. Dazu wurde von allen DC-Zonen etwas Substanz abgekratzt, diese zu einer Ciliatenkultur gegeben und im hängenden Tropfen auf ihre Schadwirkung geprüft. Diese Vorversuche zeigten, daß zwei Zonen (entsprechend dem 3,6- und 1,6-Chinon) stark phototoxisch, eine Zone (entsprechend dem 6,12-Chinon) schwach phototoxisch und alle anderen Zonen im Vergleich zum reinen Aluminiumhydroxid praktisch nicht phototoxisch waren.

Die quantitativen Prüfungen wurden mit den folgenden 4 Hauptabbauprodukten durchgeführt: B(a)p-1,6-chinon, B(a)p-3,6-chinon, B(a)p-6,12-chinon, B(a)p-säure.

3.3.1. Ergebnisse der mikroskopischen Bestimmungen

Die mikroskopisch erhaltenen Ergebnisse in Tabelle 13 zeigen, daß bei einer Konzentration von 50 µg/l B(a)p-3,6-chinon und B(a)p-1,6-chinon ebenso phototoxisch wirken wie B(a)p. B(a)p-6,12-chinon war schwächer phototoxisch und B(a)p-säure praktisch nicht phototoxisch wirksam. In Konzentrationen von 0,5 µg/l wurde sowohl bei Haltung der Kulturen im Dunkeln als auch bei Belichtung keine nachteilige Wirkung festgestellt.

Die Versuche wurden 3 mal mit guter Reproduzierbarkeit (mit zeitlichen Abweichungen von ca. 15 Minuten) durchgeführt.

	Zeit Konz.	500 µg/l	50 µg/l	5 µg/l	0,5 µg/l
Benzo(a)pyren	10 Min.	90% Letalität			Keine Änderung
	1 Std.				des Bewegungs-
	2 Std.		90% Letalität	Bewegung ver-	verhaltens
	3 Std.			langsam	"
	4 Std.			"	"
B(a)p-3,6- chinon	10 Min.				"
	1 Std.	90% Letalität			"
	2 Std.		90% Letalität	Bewegung ver-	"
	3 Std.			langsam	"
	4 Std.			"	"
B(a)p-1,6- chinon	10 Min.				"
	1 Std.	90% Letalität			"
	2 Std.		90% Letalität	Bewegung ver-	"
	3 Std.			langsam	"
	4 Std.			"	"
B(a)p-6,12- chinon	10 Min.				"
	1 Std.				"
	2 Std.				"
	3 Std.	teilweise tot	Bewegung ver-	Bewegung ver-	"
	4 Std.	"	langsam	langsam	"
	6 Std.	90% Letalität	teilweise tot	"	"
B(a)p-säure	10 Min.				"
	1 Std.				"
	2 Std.				"
	3 Std.		Bewegung ver-	Bewegung ver-	"
	4 Std.		langsam	langsam	"
	6 Std.	teilweise tot	"	"	"

Tab. 13: Schädigung der Ciliaten durch B(a)p, B(a)p-chinone und B(a)p-säure unter Lichteinwirkung im hängenden Tropfen. Bei den im Dunkeln gehaltenen Kontrollen konnte jeweils keine Änderung des Bewegungsverhaltens der Ciliaten beobachtet werden.

Höhere Konzentrationen (über 50 µg/l) scheinen zur Ermittlung von Phototoxizitätsuntersuchungen nicht zweckmäßig zu sein, da in höheren Konzentrationsbereichen durch die infolge der schlechten Wasserlöslichkeit entstehenden Substanzpartikel offenbar eine unterschiedliche Inkorporationsquote bei den Ciliaten bewirkt wird.

Im Bereich von 5 µg/l konnte innerhalb von 6 Stunden kein deutlicher Phototoxizitätsunterschied zwischen B(a)p und den verschiedenen Abbauprodukten festgestellt werden. Um zu sehen, wie in diesem Konzentrationsbereich das Wachstum der Ciliaten bei Belichtung über einen längeren Zeitraum, d.h. über 48 Stunden beeinflusst wird, wurde von den gleichen Substanzen die phototoxische Schadwirkung durch die dafür besser geeigneten photometrischen Trübungsmessungen bestimmt.

3.3.2. Ergebnisse der photometrischen Trübungsmessungen

Die photometrischen Ergebnisse der dosisabhängigen Absterberate unter 48-stündiger Belichtung sind in den Abbildungen 9 - 13 wiedergegeben.

Mit B(a)p konnte bereits bei einer Konzentration von 2,5 µg/l durch Trübungsmessung ein gehemmtes Kulturwachstum sicher erfaßt werden und 25 µg/l führten zur Klärung der Kulturen durch Absterben der Zellen. Ein Vergleich mit den getesteten B(a)p-derivaten zeigte, daß das 3,6-Chinon und 1,6-Chinon eine ähnlich hohe phototoxische Wirkung besitzen, während das 6,12-Chinon und die B(a)p-säure bedeutend schwächer sind.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von Epstein et al. (1963), die die verschiedenen Fraktionen aus atmosphärischen Stäuben bei den Einzellern *Paramecium caudatum* untersuchten. Die Fraktion mit chemisch nicht näher definierten oxidierten PAK zeigte stark photodynamische Aktivität und erwies sich im Tierversuch sogar stärker kanzerogen als die aliphatische Fraktion (Hueper et al. 1962).

Hinsichtlich der bereits ausgeführten Korrelation zwischen Kanzerogenität und Phototoxizität ist eine krebsbegünstigende Wirkung der lichtbedingten Abbauprodukte von B(a)p somit nicht auszuschließen.

Die phototoxische Grenzkonzentration für B(a)p liegt mit 2,5 µg/l bereits in einer Größenordnung, wie man sie bei stark polyzyklen-belasteten Abwässern antreffen kann (Borneff und Kunte 1967), so daß auch in gewisser ökologischer Hinsicht diese Phänomene von größter Bedeutung sein können.

Extinktion

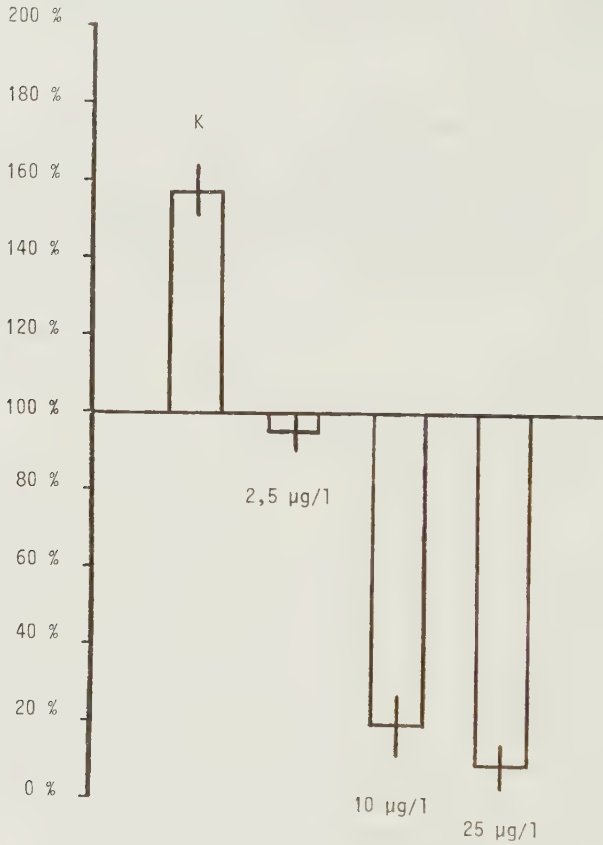


Abb. 9: Veränderung der wachstumsbedingten Trübung von Ciliatenkulturen nach 48-stündiger Belichtung in Anwesenheit von 2,5 , 10,0 und 25,0 µg/l Benzo(a)pyren, in Prozent der Extinktion zu Beginn der Belichtung. K = schadstofffreie Kontrollkultur (Mittelwerte aus jeweils 8 Messungen)

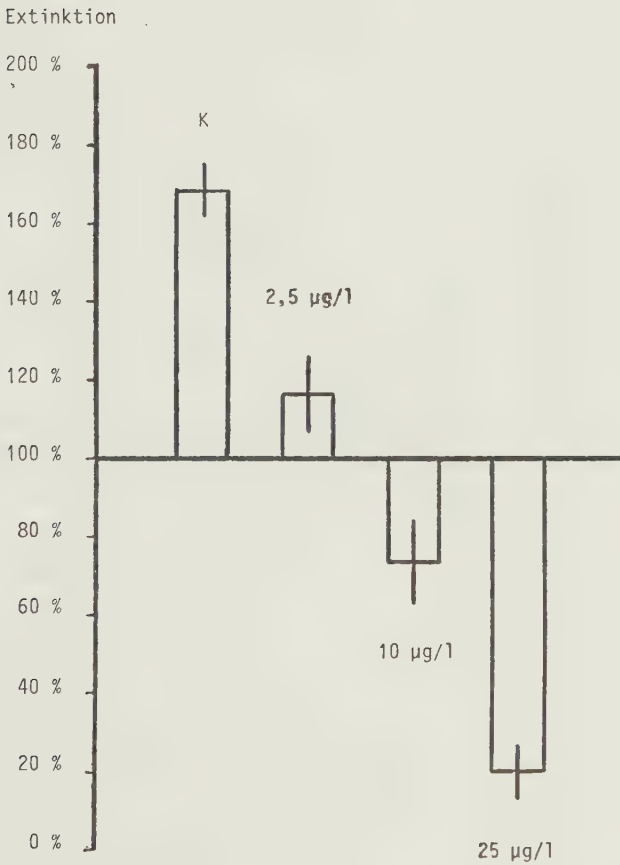


Abb.10: Veränderung der wachstumsbedingten Trübung von Ciliatenkulturen nach 48-stündiger Belichtung in Anwesenheit von 2,5 , 10,0 und 25,0 µg/l Benzo(a)pyren-3,6-chinon, in Prozent der Extinktion zu Beginn der Belichtung.

K = schadstofffreie Kontrollkultur
(Mittelwerte aus jeweils 8 Messungen)

Extinktion

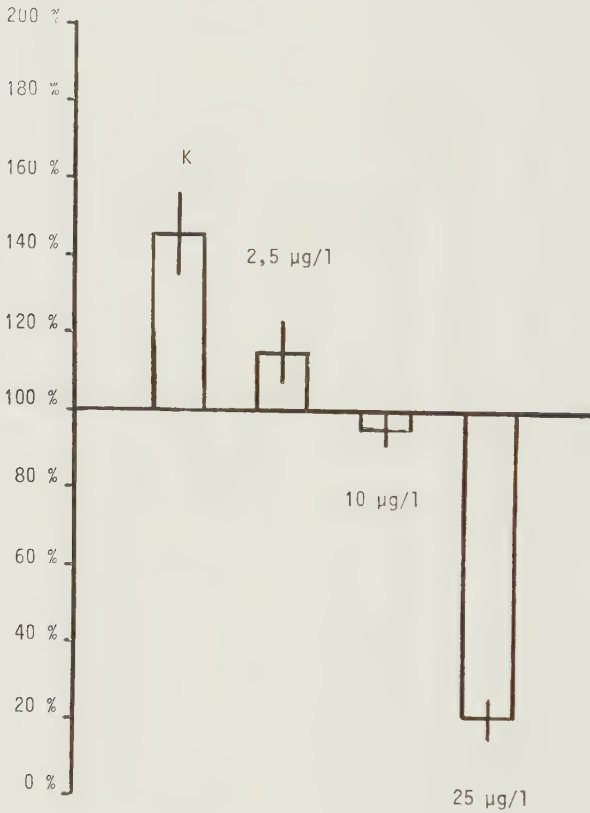


Abb.11: Veränderung der wachstumsbedingten Trübung von Ciliatenkulturen nach 48-stündiger Belichtung in Anwesenheit von 2,5 , 10,0 und 25,0 µg/l Benzo(a)pyren-1,6-chinon, in Prozent der Extinktion zu Beginn der Belichtung.

K = schadstofffreie Kontrollkultur

(Mittelwerte aus jeweils 8 Messungen)

Extinktion

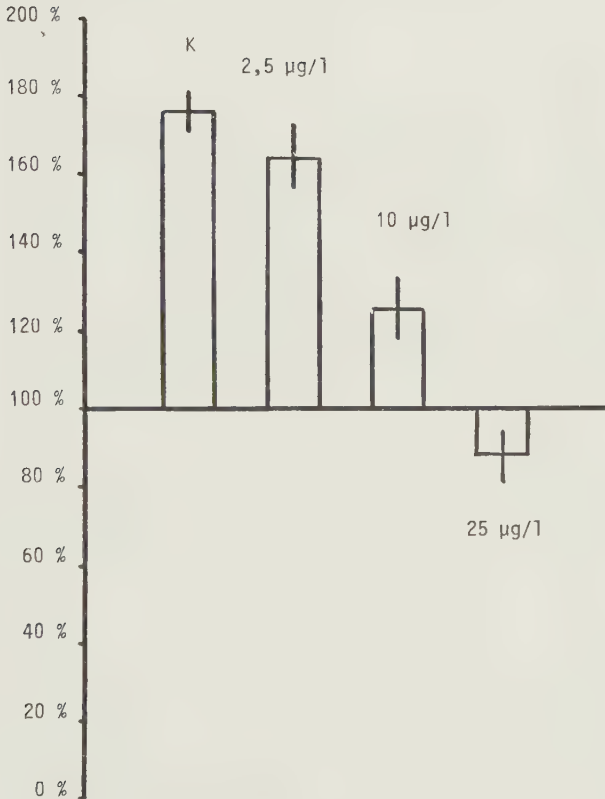


Abb. 12: Veränderung der wachstumsbedingten Trübung von Ciliatenkulturen nach 48-stündiger Belichtung in Anwesenheit von 2,5 , 10,0 und 25,0 µg/l Benzo(a)pyren-6,12-chinon, in Prozent der Extinktion zu Beginn der Belichtung.
K = schadstofffreie Kontrollkultur (Mittelwerte aus jeweils 8 Messungen)

Extinktion

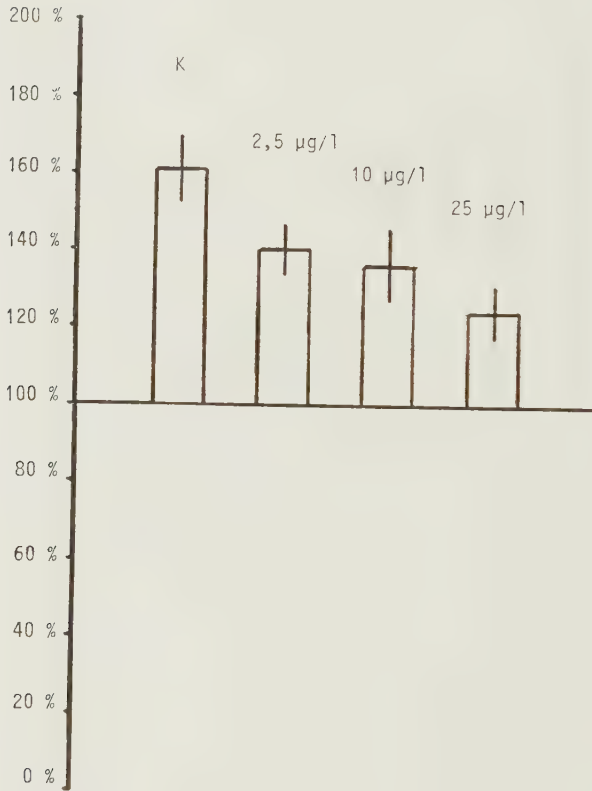


Abb. 13: Veränderung der wachstumsbedingten Trübung von Ciliatenkulturen nach 48-stündiger Belichtung in Anwesenheit von 2,5 , 10,0 und 25,0 µg/l Benzo(a)pyren-säure, in Prozent der Extinktion zu Beginn der Belichtung.
K = schadstofffreie Kontrollkultur (Mittelwerte aus jeweils 8 Messungen)

4. Mutagenitätsprüfungen an Chlamydomonas reinhardtii

4.1. Material

Testorganismen

Als Testorganismus diente die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* aus der Ordnung Volvocales. Mit dieser Alge können Genmutationen nachgewiesen werden. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung von *Chlamydomonas reinhardtii* als Testobjekt immer dann, wenn Licht oder Dunkel die Ergebnisse beeinflussen, d.h. wenn z.B. eine Testsubstanz durch Licht aktiviert oder inaktiviert wird, da diese Flagellaten auto-, mixo- oder heterotroph wachsen können (Schimmer 1975, Schimmer 1977, Schimmer und Hauber 1977).

Von den vielen Mutanten von *Chlamydomonas*, die näher untersucht und charakterisiert sind, eignet sich für quantitative (Schimmer und Hauber 1977) und halbquantitative Studien (Schimmer 1977) vor allem die argininbedürftige Mutante arg^{-1} (Paarungstyp -). Sie stammt ursprünglich aus dem Labor von R.P. Levine, der sie nach Behandlung des Wildtyps mit kurzzeitigem UV erhielt. Ihre Argininbedürftigkeit ist kerncodiert, der Gendefekt liegt auf der Kopplungsgruppe 1 (entspricht einem Chromosom) und bewirkt den Ausfall des Enzyms Acetyl-Glutamyl-Phosphat-Reduktase, das am Biosynthese-Pathway der Aminosäure Arginin beteiligt ist (Loppes 1972). Für die Versuche wurden im Dauerlicht gezogene Kulturen verwendet. Getestet wurde jeweils auf prototrophe Revertanten: $\text{arg}^{-1} \rightarrow \text{Arg}^{+}$.

Neben der argininbedürftigen Mutante wurde die streptomycinabhängige Mutante sd_3 (-18) Paarungstyp (-) verwendet. Sie wurde von Gillham (1965) durch Einwirkung von Nitrosoguanidin gewonnen. Sd -Stämme sind Mutanten des Wildtypstamms C 137

(Schimmer und Arnold 1970). Sd_3 ist extranukleär codiert. Nach Untersuchungen von Schimmer und Arnold (1970) und Behn und Arnold (1974) liegt der Erbträger vermutlich nicht in den Chloroplasten sondern in den Mitochondrien. Die Anzucht der Stämme erfolgte ebenfalls im Dauerlicht. Getestet wurde auf streptomycinunabhängige Revertanten.

Medien

Das verwendete Minimalmedium (MM) setzt sich folgendermaßen zusammen (Schimmer 1977):

Lösung A	50 ml
Phosphatpuffer (0.03 M)	50 ml
Spurenelementlösung	1 ml
$MgSO_4$ (1M)	1 ml
bidest. H_2O	900 ml

Zusammensetzung von Lösung A:

NH_4Cl	8,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0 g
$CaCl_2 \cdot H_2O$	1,0 g
bidest. H_2O	1000,0 g

Zusammensetzung der Spurenelementlösung:

EDTA	5,0 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,2 g
H_3BO_3	1,14 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,51 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,49 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,16 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,16 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,11 g
bidest. H_2O	100,0 g

Zusammensetzung der Magnesiumsulfatlösung:

$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24,5 g
bidest. H_2O	100,0 ml

Alle hier aufgeführten Chemikalien lieferte Fa. Merck, Darmstadt, in der Qualität p.a.

Zur Anzucht der arg -1^- -Zellen wurde mit 50 μg Arginin-HCl/ml supplementiert (= MM + Arg-50). Zur Herstellung der entsprechenden Festmedien für die Agarplatten wurde das Minimalmedium mit 10 μg Arginin-HCl/ml supplementiert (= MM + Arg -10) und 15 g Difco-Agar/Liter zugegeben.

Zur Anzucht der streptomycinabhängigen Algenzellen wurde dem abgekühlten Minimalmedium Streptomycinsulfat (6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt. Das Streptomycinsulfat (Fa. Bayer, Leverkusen) wurde kurz vor der Verwendung in Wasser gelöst.

Zur Herstellung der Festmedien (SM 125-Platten) für die Bestimmung der Überlebensrate der streptomycinabhängigen Algenzellen wurde dem Minimalmedium 15 g Difco-Agar/l und 125 μg Streptomycinsulfat/ml zugegeben. Die Festmedien zur Bestimmung der streptomycinunabhängigen Revertanten wurden ohne Streptomycinsulfat hergestellt.

Die Sterilisation der Medien erfolgte durch 30-minütiges Autoklavieren über 120°C bei einer Atmosphäre Überdruck.

Testsubstanzen

Neben den bereits beschriebenen Substanzen B(a)p, B(a)p-säure (S. 18) und B(a)p-chinonen (S. 40) wurden zusätzlich verwendet: Benz(a)anthracen, Indenopyren und Fluoranthen der Fa. Schuchardt, München, sowie B(a)p-4,5-oxid, das freundlicherweise von Prof. Oesch, Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, zur Verfügung gestellt wurde (Herstellung nach einer Vorschrift von Dansette und Jerina 1974).

Als Lösungsmittel diente Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Konzentration der Stammlösungen betrug 2 mg/ml.

Außerdem wurde Benzo(a)pyren getestet, das vorher in einer Acetonitrillösung ($C = 2 \text{ mg/ml}$) 4 Wochen mit Weißlicht 5 000 Lux bestrahlt wurde. Die Lösung war durch die entstandenen Oxidationsprodukte stark rotbraun gefärbt, enthielt aber noch unverändertes Benzo(a)pyren.

Aus Vergleichsgründen wurde N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) der Fa. Serva, Heidelberg, mituntersucht. Die wässrige MNNG-Lösung wurde erst kurz vor dem Versuch hergestellt, da sie sich rasch zersetzt. Durch 10-minütiges Schütteln ließ sich das MNNG fast vollständig in Wasser lösen.

Die verwendete Leberhomogenatpräparation (S 9 Mix) zur metabolischen Aktivierung von B(a)p setzt sich folgendermaßen zusammen:

Leberhomogenat (S 9)	3,0 ml
S 9 - Supplement	7,0 ml

Zusammensetzung des S 9 - Supplements:

MgSO ₄ -Lösung (17,23 mg/ml H ₂ O)	1,0 ml
NADP-Lösung (31,49 mg/ml Phosphatpuffer - pH 7,4)	1,0 ml
Glucose-6-phosphat-Lösung (12,16 mg/ml Phosphatpuffer - pH 7,4)	1,0 ml
Phosphatpuffer (0,03 M) - pH 7,4	4,0 ml

NADP (Dinatriumsalz 98 %) und Glucose-6-phosphat (Dinatriumsalz) wurde von der Fa. Boehringer/Mannheim bezogen. Das Leberhomogenat wurde von Prof. Greim, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, zur Verfügung gestellt. Seine Herstellung erfolgte aus den Lebern von mit

Phenobarbital vorbehandelten männlichen NMRI-Mäusen. Sie ist bei Ames et al. (1973 a,b) näher beschrieben. Der Proteingehalt des Leberhomogenats betrug 25 mg/ml. Das Leberhomogenat wurde bei -80°C aufbewahrt. Bei dieser Temperatur sind innerhalb von 3 Monaten praktisch keine Aktivitätsverluste zu befürchten (Ames et al. 1973 a). Für die Zubereitung des S 9 Mix, die vor jedem Versuch frisch erfolgte, wurde das Leberhomogenat rasch bei 36°C aufgetaut.

Bestrahlungskörper

Zur Anzucht der Algenkulturen dienten Weißlichtringe (Radium NL 32 W/320). Die Beleuchtungsstärke lag bei 20 000 Lux . Für die Mutationsversuche wurden Leuchtstoffröhren (Radium NL 65 W/32) entsprechend einer Beleuchtungsstärke von 5 000 Lux verwendet. Der Abstand zu den bestrahlten Objekten betrug 50 cm.

4.2. Methode

4.2.1. Schnelltest (halbquantitative Methode)

Der von Schimmer (1977) entwickelte Schnelltest beruht auf der Spotttestmethode von Jyer und Szybalski (1958).

Die Argininmutanten wurden vor jedem Versuch geklont. Zellen (etwa eine Impföse voll) eines auf MM + Arg-50 gut wachsenden Klons wurden in 2 ml Phosphatpuffer inokuliert. Die entstehende hellgrüne Zellsuspension wurde in 600 ml MM + Arg-50 Flüssigmedium eingimpft. Die Algen wurden 4 Tage im Dauerlicht (Lichtring 20 000 Lux) bei $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ und kräftiger Begasung mit Luft angezogen. Nach Erreichen einer Zelldichte von mindestens 10^6 Zellen/ml wurde die Suspension bei maximal 5 000 U/min abzentrifugiert und mit Puffer zweimal gewaschen. Anschließend wurde in 10,0 ml Puffer resuspendiert. 0,5 ml der Resuspension wurden zu 4,5 ml Puffer verdünnt (= Verdünnungs-

stufe V1). Durch weitere 1 : 10 Verdünnungsschritte wurden die Verdünnungen V4 und V5 hergestellt und in 0,1 ml Portionen auf jeweils 6 MM + Arg-10 Agarplatten ausgeplattet. Aus den entstehenden Kolonien auf V4 und V5-Platten läßt sich die Lebendzellzahl bestimmen. Die restliche Suspension wurde ebenfalls in 0,1 ml Portionen auf MM + Arg-10 Agarplatten verteilt. Bei 8 Platten pro Versuchsserie werden etwa $4,8 \times 10^7$ -Zellen auf die Reversionsrate geprüft. Das genügt, um einen Kontrollwert für die spontane Mutationshäufigkeit zu erhalten. Sobald die Plattenoberfläche trocken war, wurden Filterscheiben aufgelegt, die dann mit den entsprechenden Testlösungen beschickt wurden. Je 8 Platten wurden mit der gleichen Testlösung beschickt. Anschließend wurden die Platten ins Dauerlicht gebracht (5 000 Lux, $25 \pm 2^\circ\text{C}$). Anhand der entstandenen argininunabhängigen Arg⁺Revertanten wurde die Reversionsrate nach 15 Tagen bestimmt; die Auswertung der Lebendzellzahl erfolgte nach 5 Tagen. Ohne Verwendung von Mutagenen liegt die Zahl der Argininrevertanten etwa zwischen 10^{-8} und 10^{-7} . Durch starke Mutagene kann sich die Reversionsrate im Schnelltest bis um den Faktor 100 erhöhen.

4.2.2. Quantitativer Test mit der Argininmutante

Beim quantitativen Test wurde — wie beim Schnelltest beschrieben — eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von mindestens 10^6 Zellen/ml hergestellt. Davon wurde zunächst nur ein Teil (100 ml) abzentrifugiert (max. 5 000 U/min), zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen, und in 2 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Jeweils 0,1 ml wurden auf 8 Platten mit MM + Arg-10 Festmedium verteilt (Ermittlung der spontanen Reversionsrate bei Versuchsbeginn), und 0,5 ml wurden zu V4 und V5 verdünnt und ausgeplattet (Ermittlung der Lebendzellzahl). Der andere Teil der Zellsuspension wurde mit den entsprechenden Testlösungen versetzt und verschiedene Zeiten unter Begasung im Dauerlicht (20 000 Lux, $25 \pm 2^\circ\text{C}$) gehalten. Nach der Behandlung wurde wie bei der Kontrolle

verfahren und die Überlebensrate und die induzierte Mutationsrate durch Ausplatten auf MM + Arg-10 bestimmt. Wie beim Schnelltest wurden die Platten in Dauerlicht (5 000 Lux, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) gebracht und nach 5 bzw. 15 Tagen anhand der entstanden-
en argininunabhängigen Arg⁺-Revertanten ausgewertet.

4.2.3. Quantitativer Test mit der streptomycinabhängigen Mutante

Die streptomycinabhängigen Mutanten wurden ebenfalls vor jedem Versuch geklont. Aus Zellen eines auf SM 125-Agarplatten gut wachsenden Klons erfolgte die Anzucht und Testung wie unter 4.2.1. und 4.2.2. bereits beschrieben.

Statt Arginin wurde dem Minimalmedium allerdings Streptomycinsulfat (6,25 µg/ml) zugesetzt. Außerdem wurde die Überlebensrate auf SM 125-Agarplatten und die streptomycinunabhängigen Revertanten auf streptomycin- und argininfreiem Festmedium bestimmt.

Die Spontanmutationsrate liegt bei etwa 10^{-6} .

4.2.4. Quantitativer Test mit metabolischer Aktivierung der Testsubstanz

Die metabolische Aktivierung von Benzo(a)pyren erfolgte durch eine Leberhomogenatpräparation (S 9 Mix). Das Benzo(a)pyren wurde in DMSO gelöst ($c = 60 \text{ mg/ml}$) und dem S 9 Mix zugesetzt. Jeweils 10 ml S 9 Mix, der 6 mg Benzo(a)pyren enthielt, wurden zu 20 ml Algensuspension dazugegeben. Die Algensuspension wurde wie unter 4.2.1. und 4.2.2. beschrieben hergestellt, zusätzlich aber auf etwa 1/3 eingeeengt. Die endgültige Konzentration von Benzo(a)pyren betrug dann 200 µg/ml. Bei den zum Vergleich durchgeführten Untersuchungen ohne S 9 Mix wurde mit Puffer auf 30 ml aufgefüllt.

Die Behandlungsdauer betrug 1 und 24 Stunden. Danach wurde abzentrifugiert, 2 mal gewaschen, in jeweils 2 ml resuspendiert

und – wie unter 4.2.2. beschrieben – Lebendzellzahl, Spontanreversionsrate und Reversionsrate bestimmt.

In weiteren Versuchen wurde die Konzentration des S 9 Mix in der Algensuspension variiert.

Die verwendeten Geräte und Lösungen wurden bei beiden Tests vorher sterilisiert bzw. autoklaviert.

4.3. Untersuchungsergebnisse

4.3.1. Schnelltest mit PAK

Die ersten Versuchsserien wurden mit folgenden kanzerogenen und nicht kanzerogenen PAK durchgeführt:

Benzo(a)pyren	sehr starke Kanzerogenität
Benz(a)anthracen	starke Kanzerogenität
Indenopyren	starke Kanzerogenität
Fluoranthen	ohne Kanzerogenität

Die Bewertung der kanzerogenen Aktivität dieser PAK erfolgte nach Literaturhinweisen (Clar 1964, Preussmann 1975).

Je 8 Platten (= eine Serie) wurden mit je 0,05 ml und 0,1 ml Testlösung (= PAK in DMSO) beschickt. Die Konzentration der Testlösung wurde so gewählt, daß die endgültigen Konzentrationen an PAK pro Platte 25 – 1 000 µg betrugen.

Das Durchschnittsergebnis der 5. Verdünnung betrug 102 Kolonien, d.h. pro Platte waren $1,02 \cdot 10^7$ Zellen ausgespatelt worden. Bei 8 Platten wurden also etwa $8 \cdot 10^7$ Zellen auf ihre Reversionsrate geprüft. Das genügte, um einen Kontrollwert für die spontane Mutationshäufigkeit zu erhalten. Die in Tabelle 14 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß weder bei den nicht kanzerogenen noch bei den kanzerogenen PAK im Spotttest eine deutliche mutagene Wirkung nachzuweisen war. Die Rever-

sionsrate bei den Polyzyklen unterschied sich praktisch nicht von der spontanen Mutationsrate, die bei etwa $1,1 \cdot 10^{-8}$ lag. Eine Erhöhung um Faktor 2 liegt im Rahmen der üblichen Schwankungsbreite.

Das im Vergleich dazu mituntersuchte MNNG zeigte dagegen — unter der Annahme einer 100 %-igen Überlebensrate — eine dosisabhängige Erhöhung der Reversionsrate um das 56- bzw. um das 35-fache. MNNG gilt als eines der potentesten chemischen Mutagene bei *Chlamydomonas* (Schimmer 1975).

Die Ergebnisse zeigen, daß im *Chlamydomonas*-Spottest keine Korrelation zwischen der Mutagenität polyzyklischer Aromaten und ihrer kanzerogenen Potenz festzustellen ist. Da im Cilientest Kanzerogenität und Phototoxizität bei PAK weitgehend parallel verlaufen (s.S. 6), und da im *Chlamydomonastest* Mutagenität und Phototoxizität bei Furocumarinen ebenfalls weitgehend parallel verlaufen (Schimmer 1975) wäre eine Korrelation zwischen Mutagenität und Phototoxizität bzw. Kanzerogenität im *Chlamydomonastest* auch bei PAK durchaus zu erwarten gewesen.

Die Gründe für die fehlende Korrelation könnten sein:

PAK benötigen auch in diesem Algentest wie im Amestest metabolische Aktivierung, um mutagen zu wirken. Der Einfluß von Licht während des Testablaufs baut die PAK jedenfalls nicht zu mutagenen Metaboliten ab, bzw. Licht hat bei *Chlamydomonas reinhardtii* keine aktivierende Wirkung auf PAK im Gegensatz zu z.B. 8-Methoxalen (Schimmer und Hauber 1977).

Der reine Spotttest ist aufgrund schlechter Diffusionseigenschaften der PAK nicht geeignet.

An *Chlamydomonas reinhardtii* lassen sich keine Frame-shift-

Mutagene — wie sie die PAK darstellen — nachweisen.

Im folgenden sollen u.a. diese Punkte weiter abgeklärt werden.

4.3.2. Schnelltest mit Benzo(a)pyrenderivaten

Das durch Bestrahlung mit Weißlicht (5 000 Lux) erhaltene Gemisch aus B(a)p und B(a)p-Abbauprodukten sowie die isolierten Haupt-Oxidationsprodukte — B(a)p-1,6-, B(a)p-6,12-, B(a)p-3,6-chinon und B(a)p-säure — zeigten ebenfalls keine deutliche mutagene Wirkung (Tab. 15).

Soweit es die Chinone betrifft, stimmen unsere Ergebnisse mit denen von Jerina et al. (1976) und Wislocki et al. (1976) überein. Diese Autorengruppen konnten für die genannten Chinone an Bakterienzellen (*Salmonella typhimurium*) und an Säugetierzellen (Chinesischer Hamster) keine nennenswerte Mutagenität nachweisen. Zur B(a)p-säure liegen keine Mutagenitätsuntersuchungen vor.

4.3.3. Quantitativer Test

Um zu prüfen, ob die negativen Ergebnisse im Schnelltest auf schlechte Diffusionseigenschaften der PAK zurückzuführen sind, wurde mit Benzo(a)pyren und seinen Derivaten zusätzlich eine quantitative Mutagenitätsprüfung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer durchgeführt. Auf schlechte Diffusionseigenschaften der wasserunlöslichen PAK weisen Ames et al. (1975) im Zusammenhang mit dem Spottest an Bakterien (*Salmonella typhimurium*) hin.

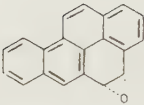
Wie in Tabelle 16 aufgeführt, werden durch längere Behandlungsdauer ebenfalls keine Mutationen induziert.

4.3.4. Quantitativer Test mit metabolischer Aktivierung der Testsubstanz

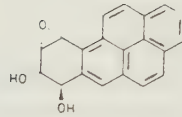
Im Mutagenitätstest mit Bakterien (*Salmonella typhimurium*) wirkt Benzo(a)pyren solitär nicht mutagen (z.B. Glatt et al. 1975). Erst unter Berücksichtigung des Säugermetabolismus, d.h. unter Zusatz geeigneter Lebermikrosomenfraktionen, wird Benzo(a)pyren in Metaboliten überführt, die bei bestimmten Salmonellastämmen Frame-shift-Mutationen auslösen (Ames et al. 1973a). Dieses Prüfverfahren wurde von Ames entwickelt und wird daher als "Ames-Test", als "Lebermikrosomenmethode" oder als "liver microsomal assay" bezeichnet. Da die Ergebnisse im Algentest trotz Lichteinfluß negativ verlaufen waren, wurde geprüft, inwieweit im Algentest Mutationen zu erfassen sind, wenn der Säugermetabolismus berücksichtigt wird. Der Algentest wurde dazu analog dem Ames-Test mit einer Leberhomogenatpräparation (S 9 Mix) kombiniert. Neben noch unbekannten Verbindungen entstehen durch mikrosomale Enzymsysteme (Monooxygenase-Reaktion) folgende Metaboliten:

3-Hydroxybenzo(a)pyren, 9-Hydroxybenzo(a)pyren, die Chinone in 3.6, 1.6 und 6.12 Stellung, die Dihydro-dihydroxybenzo(a)pyrene in den Positionen 4.5, 7.8 und 9.10 (Selkirk et al. 1974, 1976, Dehnen 1975, Kinoshita et al. 1973), 6-Hydroxymethylbenzo(a)pyren (Flesher und Syndor 1973), Benzo(a)pyren-4,5-epoxid (Grover et al. 1972), 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyren-9,10-epoxid (Sims et al. 1974) und unbeständige Metaboliten wie 6-Hydroxybenzo(a)pyren und 6-Oxobenzo(a)pyren-Radikal (Lesko et al. 1975, Nagata et al. 1974).

Bis heute konnte noch nicht sicher nachgewiesen werden, welcher Metabolit das eigentliche Karzinogen darstellt; infrage dafür kommen u.a. die Epoxide (Jerina et al. 1976, Regan et al. 1978, Kapitulnik et al. 1977, Newbold et al. 1977) und freie Radikale, evtl. als Vorstufen der Epoxide (Nagata et al. 1974) (Abb. 14).



B(a)p-4,5-oxid



7,8-Dihydro-7,8-dihydroxy-
benzo(a)pyren-9,10-epoxid

Abb. 14: Epoxide von B(a)p, die als "ultimate carcinogens" in Frage kommen.

Die Ergebnisse (Tab. 17) zeigen, daß mit B(a)p auch durch Zusatz des S 9 Mix bei *Chlamydomonas reinhardtii* keine Induktion von Mutationen möglich war. Bei den zum Vergleich durchgeführten Untersuchungen mit MNNG konnte eine Abnahme der Reversionsrate durch den S 9 Mix festgestellt werden. Möglicherweise wird das MNNG durch Lebermikrosomen zu weniger aktiven oder inaktiven Substanzen metabolisiert.

Es ist bekannt, daß sich Spezies- und Stammesunterschiede von Leberenzymen sehr massiv in der Mutagenität widerspiegeln, d.h. je nach Herkunft des aktivierenden Leberpräparates kann eine äußerst starke oder eine verschwindend geringe Mutagenität bei *Salmonella typhimurium* beobachtet werden (Oesch et al. 1976, 1977).

Um auszuschließen, daß die negativen Ergebnisse bei B(a)p durch Unwirksamkeit des S 9 Mix bedingt waren, wurde zusätzlich der bei metabolischer Aktivierung entstehende mutagene Metabolit, B(a)p-4,5-oxid, auf seine mutagene Wirkung an *Chlamydomonas* getestet. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden hierzu neben der argininbedürftigen Mutante mit nukleärem Erbträger eine streptomycinabhängige Mutante mit extra-

nukleärem Erbträger verwendet. Wie unsere Ergebnisse in Tabelle 18, 19 und 20 zeigen, konnte von B(a)p-4,5-oxid in keinem Fall ein nennenswerter mutagener Effekt nachgewiesen werden.

An Bakterienstämmen zum Nachweis von Frame-shift-Mutagenen konnte dagegen von anderen Autoren mit B(a)p-4,5-oxid im Vergleich zu B(a)p die Reversionsrate um das 100-fache erhöht werden (Jerina et al. 1976). An Bakterienstämmen zum Nachweis von Basensubstitutionsmutagenen wurde die Reversionsrate nur unwesentlich (Faktor 2) erhöht (Jerina et al. 1976, Oesch und Glatt 1976). Dies entspricht in etwa unseren Ergebnissen an Algen.

Es ist daher anzunehmen, daß die verwendeten *Chlamydomonas reinhardtii*-Stämme zum Nachweis von Frame-shift-Mutationen, wie sie von PAK-epoxiden induziert werden können, nicht geeignet sind.

Da auch an Hefen bisher nur selten Frame-shift-Mutagene nachgewiesen werden konnten (Brookes und de Serres 1976), scheinen Eukaryonten im Gegensatz zu Prokaryonten generell nicht gut zur Erfassung der mutagenen Wirkung von PAK-Epoxiden geeignet zu sein.

Testsubstanz	Konz. an Testsubstanz µg pro Platte	Konz. an Lösungsmittel ml pro Platte	Anzahl der Arg ⁺ - Revertanten pro 8 · 10 ⁷ Zellen
Benzo(a)pyren	1 000	0,1 DMSO	2
"	500	0,05 "	2
"	200	0,1 "	1
"	100	0,05 "	1
"	50	0,1 "	2
"	25	0,05 "	2
Benz(a)anthracen	50	0,1 "	2
	25	0,05 "	1
Indenopyren	50	0,1 "	1
	25	0,05 "	1
Fluoranthren	1 000	0,1 "	2
	500	0,05 "	1
	200	0,1 "	1
	100	0,05 "	2
	50	0,1 "	1
	25	0,05 "	0
MNNG	100	0,1 H ₂ O	56
	50	0,05 H ₂ O	35
Kontrolle		0,1 DMSO	1

Tab. 14: Induktion von Arg⁺-Revertanten durch PAK im Vergleich zu MNNG im Schnelltest

Testsubstanz	Konz. an Testsubstanz µg pro Platte	Konz. an Lösungsmittel (DMSO) ml pro Platte	Anzahl der Arg- Revertanten pro 9 · 10 ⁷ Zellen
Benzo(a)pyren- 3,6-chinon	50	0,1	2
	25	0,05	2
Benzo(a)pyren- 1,6-chinon	50	0,1	1
	25	0,05	2
Benzo(a)pyren- 6,12-chinon	50	0,1	1
	25	0,05	1
Benzo(a)pyren- säure	50	0,1	0
	25	0,05	1
bestrahltes Benzo(a)pyren	50	0,1	2
	25	0,05	1
Kontrolle		0,1	2

Tab. 15: Induktion von Arg⁺-Revertanten durch Benzo(a)pyren-derivate im Schnelltest

Testsubstanz	Konz. pro ml Algensuspension	Behandlungs- dauer (Std.)	Lebendzellzahl	Anzahl der Arg ⁺ -Rever- tanten	Reversionsrate	Steigerungs- faktor
Kontrolle		0	$7,1 \cdot 10^7$	2	$2,8 \cdot 10^{-8}$	
Benzo(a)pyren	20 µg	1	$5,4 \cdot 10^7$	0		
"	20 µg	3	$5,6 \cdot 10^7$	0		
"	20 µg	8	$5,7 \cdot 10^7$	2	$3,5 \cdot 10^{-8}$	1,2
"	20 µg	30	$3,5 \cdot 10^7$	2	$5,7 \cdot 10^{-8}$	2
Kontrolle		0	$13,6 \cdot 10^7$	5	$3,6 \cdot 10^{-8}$	
Benzo(a)pyren- chinongemisch (3,6, 6,12, 1,6- Chinon = 1:1:1)	20 µg	3	$16,0 \cdot 10^7$	5	$3,1 \cdot 10^{-8}$	0,9
bestrahltes Benzo(a)pyren	20 µg	3	$10,6 \cdot 10^7$	5	$4,7 \cdot 10^{-8}$	1,3
		30	$6,8 \cdot 10^7$	5	$7,3 \cdot 10^{-8}$	2
Kontrolle		0	$5,2 \cdot 10^7$	4	$8 \cdot 10^{-8}$	
B(a)p-säure	20 µg	3	$4,8 \cdot 10^7$	3	$6,2 \cdot 10^{-8}$	0,8
"	30		$6,4 \cdot 10^7$	5	$7,8 \cdot 10^{-8}$	0,8
MNNG	50 µg	0,5	$3,3 \cdot 10^7$	102	$3,0 \cdot 10^{-6}$	37

Tab. 16: Induktion von Arg⁺-Revertanten durch B(a)p und B(a)p-derivate in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

Testsubstanz	Konz. pro ml Algensuspension	Behandlungs- dauer	Lebendzellzahl	Anzahl der Arg ⁺ -Rever- tanten	Reversionsrate	Steigerungs- faktor
Kontrolle (H ₂ O)		25 Minuten	7,7 · 10 ⁷	1	1,3 · 10 ⁻⁸	
S 9 Mix*		25 "	9,54 · 10 ⁷	3	2,5 · 10 ⁻⁸	1,9
MNNG	100 µg	25 "	0,21 · 10 ⁷	22	7,8 · 10 ⁻⁶	600
MNNG + S 9 Mix*	100 µg	25 "	0,99 · 10 ⁷	57	5,7 · 10 ⁻⁶	438
Kontrolle (H ₂ O)		60 Minuten	10,1 · 10 ⁷	2	1,9 · 10 ⁻⁸	
S 9 Mix*		60 "	13,4 · 10 ⁷	4	2,9 · 10 ⁻⁸	1,5
B(a)p	200 µg	60 "	6,8 · 10 ⁷	3	4,5 · 10 ⁻⁸	2,3
B(a)p + S 9 Mix*	200 µg	60 "	10,3 · 10 ⁷	7	6,7 · 10 ⁻⁸	3,5
Kontrolle (H ₂ O)		24 Stunden	8,2 · 10 ⁷	0		
S 9 Mix**		24 "	8,5 · 10 ⁷	0		
B(a)p	200 µg	24 "	6,2 · 10 ⁷	3	4,8 · 10 ⁻⁸	> 4
B(a)p + S 9 Mix**	200 µg	24 "	7,5 · 10 ⁷	3	4,0 · 10 ⁻⁸	> 3,3

* Konzentration des S 9 Mix betrug 10 ml/ 30 ml Algensuspension

** Konzentration des S 9 Mix betrug 10 ml/100 ml Algensuspension

Tab. 17: Induktion von Arg⁺-Revertanten durch MNNG und B(a)p bei gleichzeitiger Metabolisierung

Konz. an B(a)p-4,5-oxid µg pro Platte	Konz. an Lösungsmittel (DMSO) ml pro Platte	Anzahl der Arg ⁺ -Rever- tanten pro 1,1 · 10 ⁵ Zellen (= pro 8 Platten)	Steigerungs- faktor
10	0,1	20	1,5
100	0,1	13	0,9
Kontrolle	0,1	14	1

Tab. 18: Induktion von Arg⁺-Revertanten durch Benzo(a)pyren-4,5-oxid im Schnelltest

Testsubstanz	Konz. pro ml Algensuspension	Behandlungs- dauer (Std.)	Lebendzellzahl	Anzahl der Arg-Rever- tanten	Reversions- rate	Steigerungs- faktor
B(a)p-4,5-oxid	10 µg (in 10 µl DMSO)	1	$11,2 \cdot 10^7$	25	$2,2 \cdot 10^{-7}$	1,7
Kontrolle	- (10 µl DMSO)	1	$7,2 \cdot 10^7$	9	$1,25 \cdot 10^{-7}$	
B(a)p-4,5-oxid	10 µg (in 10 µl DMSO)	24	$16 \cdot 10^7$	34	$2,1 \cdot 10^{-7}$	1,4
Kontrolle	- (10 µl DMSO)	24	$12,8 \cdot 10^7$	19	$1,48 \cdot 10^{-7}$	

Tab. 19: Induktion von Arg⁺-Revertanten durch B(a)p-4,5-oxid in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

Testsubstanz	Konz. pro ml Allgensuspension	Behandlungs- dauer (Std.)	Lebendzellzahl	Anzahl der Mutanten	Reversions- rate	Steigerungsfaktor
B(a)p-4,5-oxid	10 µg	0,5	$2,8 \cdot 10^7$	74	$26,4 \cdot 10^{-7}$	1,7
bestrahltes B(a)p	10 µg	0,5	$4,8 \cdot 10^7$	51	$10,5 \cdot 10^{-7}$	0,7
MNNG (Vergleichs- substanz)	50 µg	0,5	$8 \cdot 10^4$	39	$4875 \cdot 10^{-7}$	316
Kontrolle (DMSO)	(10 µl)	0,5	$6,2 \cdot 10^7$	96	$15,4 \cdot 10^{-7}$	
B(a)p-4,5-oxid	10 µg	2	$1,6 \cdot 10^7$	73	$45,6 \cdot 10^{-7}$	2,2
B(a)p-4,5-oxid	5 µg		$2,0 \cdot 10^7$	72	$36,0 \cdot 10^{-7}$	1,7
bestrahltes B(a)p	10 µg		$6,4 \cdot 10^5$	0 (zu toxisch)		
Kontrolle (DMSO)	(10 µl)		$5,8 \cdot 10^7$	118	$20,3 \cdot 10^{-7}$	
B(a)p-4,5-oxid	5 µg	24	$5,6 \cdot 10^7$	15	$2,7 \cdot 10^{-7}$	2,5
bestrahltes B(a)p	10 µg		$3,2 \cdot 10^5$	0 (zu toxisch)		
Kontrolle (DMSO)	(10 µl)		$17,6 \cdot 10^7$	19	$1,079 \cdot 10^{-7}$	

Tab. 20: Induktion von streptomycinunabhängigen Mutanten durch B(a)p-derivate in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

D. DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse im Ciliatenlichttest mit *Tetrahymena pyriformis* zeigen, daß von den vier untersuchten Photo-Oxidationsprodukten des B(a)p, B(a)p-3,6-chinon und B(a)p-1,6-chinon stark und B(a)p-6,12-chinon schwach phototoxisch wirksam waren. Die von Gräf und Haller (1977) nachgewiesene phototoxische Wirkung des durch Bestrahlung von B(a)p erhaltenen Gemisches verschiedener Abbauprodukte beruht demnach auf den Chinonen.

Gemäß der Korrelation zwischen Phototoxizität und Kanzerogenität läßt sich vermuten, daß die Chinone eine kanzerogene Wirkung besitzen. Die Beobachtung, daß bei Umweltstäuben bzw. Luftaerosolen verschiedener Herkunft keine Korrelation zwischen kanzerogener Wirksamkeit und ihrem PAK-Gehalt besteht, könnte somit durch derartige aktive photochemische Umsetzungsprodukte zu erklären sein.

Ein sicherer Schluß kann natürlich nicht gezogen werden, da der Phototoxizitätstest nur einen Vortest darstellt und im Einzelfall die Möglichkeit falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse beinhaltet (s.S. 4-7). Es ist jedoch zu bemerken, daß die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe im verwendeten Testsystem bereits eine gute Übereinstimmung zwischen ihrer phototoxischen und kanzerogenen Potenz gezeigt haben.

Die Prüfung von bestrahltem B(a)p sowie der einzelnen Abbauprodukte im Mutagenitätstest mit *Chlamydomonas reinhardtii* ergaben dagegen negative Ergebnisse. Obwohl Mutagenität und Kanzerogenität im allgemeinen weitgehend parallel verlaufen (s.S.8), muß hier zunächst berücksichtigt werden, daß in dem verwendeten Algentestsystem bisher noch keine polyzyklischen Kohlenwasserstoffe bzw. deren Metaboliten untersucht wurden. Um festzustellen, inwieweit bei dieser Substanzklasse die Kanzerogenität mit der Mutagenität an Algen übereinstimmt, wurden ent-

sprechende Versuche durchgeführt.

Analog dem bakteriellen Testsystem wurden B(a)p unter Zusatz von Lebermikrosomen zur metabolischen Aktivierung sowie der als mutagen bekannte Metabolit B(a)p-4,5-oxid auf ihre mutagene Wirkung an *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht. Es konnte jedoch in keinem Fall ein nennenswerter Effekt nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß das angewandte Algentestsystem im Gegensatz zum bakteriellen Testsystem für die Gruppe der PAK zur Erfassung von Mutationen nicht geeignet ist. Gestützt wird diese Annahme durch nachfolgend aufgeführte Untersuchungsergebnisse aus der Literatur.

Die durch Lebermikrosomenfraktionen gewonnenen Metaboliten bzw. Epoxide von B(a)p und anderer PAK weisen im Salmonella-Mutagenitätstest nur an den Stämmen TA 1537, TA 1538, TA 98 mutagene Wirkung auf. An diesen Stämmen lassen sich nur Frame-shift-Mutationen (Abb. 15) induzieren. Am Stamm TA 1535, an dem Basenpaar-Mutationen ausgelöst werden können, sind die Epoxide der PAK inaktiv (Ames et al. 1972, Oesch und Glatt 1976).

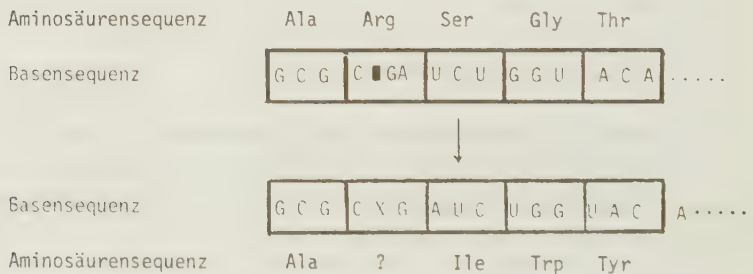


Abb. 15: Modell der Entstehung von Frame-shift-Mutationen durch interkalierte Kohlenwasserstoffepoxide (■) nach Sims und Grover (1974). x = zusätzliche Base

Auch an bestimmten Bakteriophagenstämmen wirken B(a)p-epoxide nur als Frame-shift-Mutagene (Sims und Grover, 1974). Die bei Drosophila nachweisbaren Mutationen durch B(a)p-metaboliten (Deletionen in den Genen für r- und t-RNS) resultieren möglicherweise ebenfalls aus Frame-shift-Mutationen (Sims und Grover, 1974).

Frame-shift-Mutagene zeigen jedoch nach den bisherigen Ergebnissen an Chlamydomonasteststämmen keinen nennenswerten Effekt.

So wirkt z.B. 8-Methoxypsoralen bei Chlamydomonas nicht im Dunkeln, sondern nur im NUV-Bereich (320 - 380 nm) stark mutagen (Schimmer und Hauber 1977). Diese Substanz induziert nach Bridges et al. (1978) im Dunkeln aber Frame-shift-Mutationen sowohl bei Escherichia coli als auch bei Salmonella typhimurium, während sie bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht Basenpaar-Substitutionen erzeugt. Proflavin und Ethidiumbromid stellen ebenfalls Frame-shift-Mutagene dar, die bei Chlamydomonas wenig aktiv sind (McCann et al. 1975, Grobe 1972).

MNNG und Äthylmethansulfonat, die nachgewiesenermaßen in Chlamydomonas mutagen wirken (Schimmer 1975, Kovalinkova et al. 1974), sind dagegen als Basenpaar-Mutagene bekannt (Ames et al. 1973 b, McCann et al. 1975).

Es ist daher wahrscheinlich, daß die verwendeten Chlamydomonas reinhardtii-Stämme zum Nachweis von Frame-shift-Mutationen, wie sie von PAK-Epoxiden bzw. von PAK unter metabolischer Aktivierung induziert werden können, nicht geeignet sind. Da auch an Hefen bisher nur selten Frame-shift-Mutationen nachgewiesen werden konnten (Brookes und de Serres 1976), sind unter Umständen Eukaryonten generell nicht geeignet.

Möglicherweise spielt auch die Zellwand eine Rolle. Von Bakterien ist zumindest bekannt, daß die Lipopolysaccharid-

komponente der äußeren Hülle die Mutagenität durch PAK beeinflussen kann — eine Tatsache, die darauf hinweist, daß Zellwände ein Hindernis für Substanzen vom Typ PAK darstellen können (Sims und Grover 1974, Ames et al. 1972). Die im Ames-Test verwendeten Salmonellastämme besitzen alle einen reduzierten Lipopolysaccharidgehalt, wodurch das Eindringen von Substanzen erleichtert wird. Auf Probleme mit der Zellwandpermeabilität bei *Saccharomyces cerevisiae*- und Bakteriophagenstämmen weisen auch Brusick (1974) sowie Sims und Grover (1974) hin.

Von Bedeutung für die Ausprägung mutagener Effekte sind u.a. Reparaturmechanismen der Zelle. Jede Zelle verfügt über eine Reihe von Enzym-Systemen, die zur Reparatur induzierter mutativer Veränderungen in der DNS befähigt sind (Gebhart 1977 a). Da bisherige Erkenntnisse darauf hinweisen, daß Epoxid-alkylierte-DNS in Testsystemen mit Reparaturmechanismus repariert wird (Stich und San 1973), besteht die Möglichkeit, daß die Algenzellen in der Lage sind, evtl. durch B(a)p gesetzte Schäden der DNS zu eliminieren.

E.coli (Hcr^+) Stämme zumindest scheinen unter UV-Einwirkung in der Lage zu sein, Photoaddukte von B(a)p mit Pyrimidinen der DNS zu eliminieren — im Gegensatz zu *E.coli* (Hcr^-) Stämmen, bei denen die nicht eliminierbaren Photoaddukte Mutationen erzeugen (Nishioka und Yakoyama 1973).

Was die Frage nach der Mutagenität der phototoxischen Chinone betrifft, so sind sie vermutlich nicht mutagen, da auch von anderen Autorengruppen weder an Bakterienzellen (Jerina et al. 1976) noch an Säugetierzellen (Wislocki et al. 1976) eine nennenswerte Mutagenität zu beobachten war. Diese Testsysteme zeigen bei PAK-Metaboliten eine weitgehende Korrelation zwischen Mutagenität und Kanzerogenität.

Wislocki und Mitarbeiter geben zu bedenken, daß auch Chinone mit Stickstoffbasen reagieren und als Schiff'sche Basen kovalente Bindungen mit der DNS eingehen können, so daß B(a)p-derivate trotz geringer oder zu vernachlässigender mutagener Wirkung eine Rolle hinsichtlich der Kanzerogenität von B(a)p spielen könnten. Es wäre z.B. möglich, daß einige dieser Metaboliten als Promotor fungieren, oder daß sie den in vivo-Metaboliten des ursprünglichen PAK oder eines nahestehenden Kanzerogens beeinflussen.

Zur weiteren Abschätzung der von den B(a)p-chinonen ausgehenden Risiken sind daher entsprechende Tierversuche notwendig. Da sich die Chinone in unseren Untersuchungen zur Stabilität als lichtempfindlich erwiesen haben, kann jedoch mit Sicherheit gesagt werden, daß ihre Umweltpersistenz zumindest limitiert ist.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der umwelthygienischen Relevanz der Photo-Oxidationsprodukte des Kanzerogens Benzo(a)pyren (B(a)p). B(a)p wurde auf Dünnschichtplatten mit kurz- und langwelligem sowie sichtbarem Licht bestrahlt und aufgetrennt. Die dabei nachgewiesenen Hauptabbauprodukte B(a)p-3,6-chinon, B(a)p-6,12-chinon, B(a)p-1,6-chinon und 7H-Benz-(d,e)anthracen-7-on-3,4-dicarbonsäure (B(a)p-säure) wurden auf ihre phototoxische Wirkung an Ciliaten der Art *Tetrahymena pyriformis* und auf ihre mutagene Wirkung an Phytoflagellaten der Art *Chlamydomonas reinhardtii* geprüft.

Hierbei erwiesen sich B(a)p-3,6-chinon und B(a)p-1,6-chinon als stark phototoxisch und B(a)p-6,12-chinon als schwach phototoxisch wirksam. Mutationen konnten bei keinem Photo-Oxidationsprodukt sicher nachgewiesen werden. Möglicherweise ist *Chlamydomonas reinhardtii* für die Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe zur Erfassung von Mutationen nicht geeignet, da B(a)p bzw. B(a)p-metaboliten Frame-shift-Mutationen induzieren und an *Chlamydomonas reinhardtii* vermutlich nur Basentransitionen erzeugt werden können. Nachdem jedoch mit anderen Testsystemen von zwei verschiedenen Autorengruppen ebenfalls keine sichere mutagene Wirkung der Chinone festgestellt werden konnte, ist zu vermuten, daß die Chinone nicht mutagen sind.

Zur weitgehenden Korrelation zwischen Phototoxizität und Kanzerogenität sowie Mutagenität und Kanzerogenität wird eine Literaturübersicht und Stellungnahme gegeben.

Von den Chinonen als phototoxische Komponenten wurde außerdem die Stabilität unter Lichteinfluß quantitativ bestimmt. Die Chinone erwiesen sich als lichtempfindlich, wenn auch nicht in dem Maße wie B(a)p. Die Abbaugeschwindigkeit hing von der Art des Chinons und der verwendeten Lichtquelle ab.

Die Ergebnisse zeigen, daß gemäß der weitgehenden Korrelation zwischen Phototoxizität und Kanzerogenität B(a)p-3,6-chinon und B(a)p-1,6-chinon mit hoher Wahrscheinlichkeit noch eine kanzerogene Wirkung besitzen, ihre Umweltpersistenz aufgrund ihrer Lichtempfindlichkeit aber limitiert ist.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Alexander, P., Fox, M.:

Photodynamic degradation of macromolecules sensitized by dyes and carcinogenic hydrocarbons.

Proc. First Int. Photobiol. Congress, Amsterdam (1954) 336-339

Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D.:

Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.

Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (1973 a) 2281-2285

Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E.:

An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens.

Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (1973 b) 782-786

Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E.:

Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test.

Mutation Res. 31 (1975) 347-364

Ames, B.N., Sims, P., Grover, P.L.:

Epoxides of carcinogenic polycyclic hydrocarbons are frame-shift mutagens.

Science 176 (1972) 47-49

Andelmann, J.B., Suess, M.J.:

Photodecomposition of 3,4-benzpyrene sorbed on calcium carbonate.

Org. Compounds Aquatic Environ., Rudolfs Res. Conf., 5th (1969), Chemical Abstracts 77 (1972) 74576 d

Andelmann, J.B., Suess, M.J.:

Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment.

Bull. Org. mond. Santé 43 (1970) 479-508

Andrews, A.W., Thibault, L.H., Lijinsky, W.:
The relationship between carcinogenicity and mutagenicity of
some polynuclear hydrocarbons.

Mutation Res. 51 (1978) 311-318

Antonella, D., Carlassare, F.:

Products of photooxidation of benzo(a)pyrene in ultraviolet
light.

Atti, Ist. Veneto Sci. Lettere Arti, Classe Sci. Mat. Nat.

122 (1964) 9-19, Chemical Abstracts 64 (1966) 9129

Aretz, J.:

Photochemie (Methoden der organ. Chemie Bd.IV/5a).

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1975)

Arnold, C.G.:

Gene außerhalb des Zellkerns

Biol. uns. Zeit 1 (1971) 111-121

Bartram, C.R., Rüdiger, H.W.:

Chromosomenanomalien bei malignen Tumoren.

Klin. Wschr. 56 (1978) 733-741

Basler, A., Herbold, B., Peter, S., Röhrborn, G.:

Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons. II. Monitoring gene-
tical hazards of chrysene in vitro and vivo.

Mutation Res. 48 (1977) 249-254

Basler, A., Röhrborn, G.:

Chromosome aberrations in oocytes of NMRI mice and bone marrow
cells of Chinese Hamsters induced with 3,4-benzpyrene.

Mutation Res. 38 (1976) 327-332

Bauer, K.H.:

Mutationstheorie der Geschwulstentstehung.

Springer Verlag, Berlin (1928)

Bauer, K.H.:

zit. bei Gräf, W. 1976

Bauer, L.:

Über die Steigerung phototoxischer Wirkungen polyzyklischer Aromaten durch Haushaltsspülmittel (Tenside).

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 164 a (1977) 455-468

Bauer, L.:

persönliche Mitteilung 1978

Bauer, L., Gräf, W.:

Über das Zusammenwirken von polyzyklischen Aromaten und Licht unter dem Gesichtspunkt der Syncancerogenese.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 161 (1976) 304-316

Bayer, U., Bauknecht, T.:

The dose-dependence of sister chromatid exchanges induced by 3 hydrocarbons, in the in vivo bone marrow test with Chinese Hamsters.

Experientia 33 (1977) 25-27

Behn, W., Arnold, C.G.:

Unterschiedliche genetische Konstitution von Chloroplast und Mitochondrien bei antibiotikaabhängigen Mutanten von Chlamydomonas reinhardtii.

Protoplasma 82 (1974) 91-101

Böhrer, J., Schmidt, P.:

Praktische Erfahrungen mit einem automatischen Auswertesystem für Dünnschichtplatten.

Acta Pharm. Technol. Suppl. 7 (1979) 135-138

Borneff, J., Knerr, R.:

Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden.

Arch. Hyg. 143 (1959) 405-415

Borneff, J., Kunte, H.:

Wirkung der Abwasserreinigung auf polyzyklische Aromaten.

Arch. Hyg. 151 (1967) 202-210

Borneff, J., Selenka, F., Kunte, H., Maximos, A.:

Die Synthese von 3,4-Benzpyren und anderen polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen in Pflanzen.

Arch. Hyg. 152 (1968) 279-282

Boveri, T.:

Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.

G. Fischer Verlag, Jena (1914)

Boyland, E.:

Mutagenesis and carcinogenesis

Arch. Geschwulstforsch. 45 (1975) 625-627

Boyland, E., Dontenwill, W., Falk, H.L., Gori, B.G.,

Kipling, M.D., Miller, R.W., Terracini, B.:

Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds.

IARC Monograph of the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man 3 (1973) 91-136

Breinlich, J.:

Zur chromatographischen Prüfung der Teerarten des Deutschen Arzneibuchs unter Berücksichtigung des 3,4-Benzpyrengelhaltes des Steinkohlenteers und dessen fermentativen Abbaus durch Peroxydasen in vitro.

Pharm. Ztg. 46 (1964) 1744-1748

Bridges, A.B.:

Short term screening tests for carcinogens.

Nature (London) 261 (1976) 195-200

Bridges, B.A., Mottershead, R.P., Albert, C.E.:
8-Methoxypsoralen as a frameshift mutagen in bacteria and
Chinese Hamster cells in the dark - implications for genetic
risk in man.

Mutation Res. 53 (1978) 156

Brookes, P.:

Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons.

Mutation Res. 39 (1977) 257-284

Brookes, P., De Serres, F.J.:

Report of the workshop on the mutagenicity of chemical car-
cinogens.

Mutation Res. 38 (1976) 155-160

Brookes, P., Heidelberger, C.:

Isolation and degradation of DNA from cells treated with
tritium-labeled 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene: Studies on
the nature of the binding of this carcinogens to DNA.

Cancer Res. 29 (1969) 157-165

Brookes, P., Lawely, P.D.:

Evidence for binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to
the nuclear acid of mouse skin. Relation between carcinogenic
power and their binding to DNA.

Nature (London) 203 (1964) 781-784

Brusick, D.:

zit. bei Brookes, P., De Serres, F.J.

1976

Burckhardt, W.:

zit. bei Wulf, K.

1968

Burdette, W.J.:

The significance of mutation on relation to the origin of tumors: a review.

Cancer Res. 15 (1955) 201-226

Calcutt, G.:

The photosensitizing action of chemical carcinogens.

Br. J. Cancer 8 (1954) 177-180

Cavalieri, E., Calvin, M.:

Photochemical coupling of benzo(a)pyrene with 1-methylcytosine: photoenhancement of carcinogenicity.

Photochem. Photobiol. 14 (1971) 641-653

Chromwell, N.H.:

Chemical carcinogens, carcinogenesis and carcinostasis.

Amer. Scient. 55 (1965) 213-236

Clar, E.:

Polycyclic hydrocarbons.

Bd. 2, Academic Press London-New York, Springer Verlag,

Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964) 302

Cook, J., Schoental, R.:

Catalysed hydrogen peroxide oxidation of aromatic hydrocarbons Part 1.

J. Chem. Soc. 1 (1950) 47-54

Coombs, M.M., Dixon, C., Kissonerghis, A.-M.:

Evaluation of the mutagenicity of compounds of known carcinogenicity, belonging to the benz(a)anthracene, chrysene, and cyclopenta(a)phenanthrene series, using Ames's test.

Cancer Res. 36 (1976) 4525-9

Dansette, P., Jerina, D.M.:

A facile synthesis of arene oxides at the K-region of polycyclic hydrocarbons.

J. Amer. Chem. Soc. 96 (1974) 1224-1225

Dehnen, W.:

Untersuchungen über den Metabolismus von Benzo(a)pyren in Alveolarmakrophagen.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 161 (1975) 1-25

Doniach, I.:

A comparison of the photodynamic activity of some carcinogenic with non-carcinogenic compounds.

Br. J. Exp. Pathol. 20 (1939) 227-235

Doniach, I., Mottram, J.C.:

On the effect of light upon the incidence of tumors on painted mice.

Am. J. Cancer 39 (1940) 234-240

Ebel, S., Hocke, J.:

Vollautomatische rechnergesteuerte Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen.

Chromat. 10 (1977) 123-128

Epstein, S.S., Burroughs, M., Small, M.:

The photodynamic effect of the carcinogen, 3,4-benzpyrene, on paramecium caudatum.

Cancer Res. 23 (1963) 35-44

Epstein, S.S., Small, M., Falk, H.L., Mantel, N.:

On the association between photodynamic and carcinogenic activities in polycyclic compounds.

Cancer Res. 24 (1964) 855-862

Epstein, S.S., Small, M., Koplan, J., Mantel, N., Hutner, S.H.:
Photodynamic bioassay of benzo(a)pyrene with paramecium cau-
datum.

J. Natl. Cancer Inst. 31 (1963) 163-168

Epstein, S.S., Small, M., Koplan, J., Mantel, N., Falk, H.L.,
Sawicki, E.:

Photodynamic bioassay of polycyclic air pollutants.

Arch. Environ. Health 7 (1963) 531-537

Flesher, J.W., Syndor, K.L.:

Possible role of 6-hydroxymethyl-benzo(a)pyrene as a proximate
carcinogen of benzo(a)pyren and 6-methyl-benzo(a)pyren.

Int. J. Cancer 11 (1973) 433-437

Frohberg, H.:

Kanzerogenese, Teratogenese, Mutagenese: Beziehung zwischen
tierexperimentellen und klinischen Befunden.

Arzneim. Forsch. 28 (1978) 1984-2001

Gebhart, E.:

Chemische Mutagenese.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York (1977 a)

Gebhart, E.:

Erbgutschädigung und maligne Entartung.

Medizin 5 (1977 b) 1759-1768

Gelboin, H.V.:

A microsome-dependent binding of benzo(a)pyren to DNA.

Cancer Res. 29 (1969) 1272-1276

Glatt, H.R., Oesch, F., Frigerio, A., Garattini, S.:

Epoxides metabolically produced from some known carcinogens
and from some clinically used drugs.

Int. J. Cancer 16 (1975) 787-797

Gottschalk, W.:

Allgemeine Genetik.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978) 1955

Gräf, W.:

Gefährdung durch kanzerogene Substanzen in der Umwelt.

Öff. Gesundh.-Wes. 33 (1971) 121

Gräf, W.:

Kanzerogene Stoffe (Mensch und Umwelt).

Daten und Dokumente zum Umweltschutz 19 (1976) 195-205

Gräf, W., Diehl, H.:

Über den naturbedingten Normalpegel kanzerogener polycyclischer Aromate und seine Ursache.

Arch. Hyg. 159 (1966) 49-58

Gräf, W., Haller, A.G.:

Die Phototoxizität kanzerogener polyzyklischer Aromate und ihrer Umwandlungsprodukte im biologischen Modellversuch.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 164 (1977) 250-261

Gräf, W., Nothafft, G.:

Trinkwasserchlorung und Benzpyren.

Arch. Hyg. 147 (1963) 135-146

Graffi, A., Kriegel, H., Schneider, E.J., Sydow, G., Beyer, V., Guse, I., Kügler, L.:

Versuche über die photodynamische Wirkung des Benzpyren auf einige Mitochondrienfermente der Rattenleber.

Arch. Geschwulstforsch. 6 (1953 a) 226-241

Graffi, A., Kriegel, H., Schreiber, H., Windisch, F.:

Die photosensibilisierende Wirkung verschiedener kanzerogener Kohlenwasserstoffe auf die Hefezellen.

Z. Naturforsch. 8 b (1953 b) 142-145

Grobe, B.:

Wirkung von Proflavin und Ethidiumbromid auf *Chlamydomonas reinhardtii*.

Zulassungsarbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen 1972

Grover, P.L., Hewer, A., Sims, P.:

Formation of K-region epoxides as microsomal metabolite pyrene and benzo(a)pyrene.

Biochem. Pharmacol. 21 (1972) 2731-2726

Hansemann, D. von:

Über asymmetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung.

Virch. Arch. 119 (1890) 299-321

Harris, C.C., Autrup, H., Connor, R., Barrett, L.A.,

McDowell, E.M. Trump, B.S.:

Zur Frage des individuellen Lungenkrebsrisikos beim Zigarettenrauchen.

Dtsch. med. Wschr. 103 (1978) 323

Heidelberger, Ch.:

Chemical carcinogenesis.

Ann. Rev. Biochem. 33 (1975) 79-121

Hettche, H.O.:

Vergleichende Betrachtung zur Belastung der Luft durch Ruß und Kohlenstoffverbindungen in der Bundesrepublik und anderen Ländern.

Staub 23 (1963) 136-140

Huberman, E.:

Mammalian cell transformation and cell mediated mutagenesis by carcinogenic polycyclic hydrocarbons.

Mutation Res. 29 (1975) 285-291

Hueper, W.C., Kotin, P., Tabor, E.C., Payne, W.W., Falk, H., Sawicki, E.:

Carcinogenic bioassay on air pollutants.

Arch. Path. 74 (1962) 89-116

Isbell, S., Tipson, R.S.:

Photochemical changes in thin layer chromatograms of polycyclic, aromatic hydrocarbons.

Analyt. Chem. 36 (1964) 2505-2506

Jäger, J., Kassowitzova, B.:

Breakdown of 3,5-benzopyrene in water.

Cesk. Hyg. 13 (1968) 288-292, Chemical Abstracts 69 (1968) 6550 w

Jeftic, L., Adams, R.N.:

Electrochemical oxidation pathways of benzo(a)pyrene.

J. Amer. Chem. Soc. 92 (1970) 1332-1337

Jerina, D.M., Yagi, H., Hernandez, O., Dansette, P.M., Wood, A.W., Levin, W., Chang, R.L., Wislocki, P.G., Conney, A.H.:

Synthesis and biologic activity of potential benzo(a)pyrene metabolites.

Carcinogenesis 1 (1976) 91-113

Jernström, B., Vadi, H., Orrenius, S.:

Formation on isolated rat liver microsomes and nuclei of benzo(a)pyrene metabolites that bind to DNA.

Cancer Res. 36 (1976) 4107-4113

Jyer, V.N., Szybalski, W.:

Two simple methods for the detection of chemical mutagens.
Appl. Microbiol. 6 (1958) 23-29

Kapitulnik, J., Levin, W., Conney, A.H.:

Benzo(a)pyrene 7,8-dihydrodiol is more carcinogenic than
benzo(a)pyrene in newborn mice.
Nature (London) 266 (1977) 378-380

Karatsune, M., Hirohata, T.:

Decomposition of polycyclic aromatic hydrocarbons under
laboratory illuminations.
Nat. Cancer Inst. Monogr. 9 (1962) 117-24

Kidder, G.W., Dewey, V.C.:

The biochemistry of ciliates in pure culture.
In: Wolff, E. (ed.): Biochemistry and Physiology of Protozoa,
Academic Press Inc., New York (1951) 323-340

Kinoshita, N., Shears, B., Gelboin, H.:

K-region and non-K-region metabolism of benzo(a)pyrene by rat
liver microsomes.
Cancer Res. 33 (1973) 1937-1944

Knorr, M., Schenk, D.:

Zur Frage der Synthese polyzyklischer Aromaten durch Bakterien.
Arch. Hyg. 152 (1968) 282-285

Konvalinkova, W., Matayne, R.F., Loppes, R.:

Induction and analysis of revertants from various arg-7
mutants lacking argininosuccinate lyase in Chlamydomonas
reinhardtii.
Mutation Res. 24 (1974) 69-72

Krahn, D., Heidelberger, Ch.:

Liver homogenate-mediated mutagenesis in Chinese Hamster V 79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins. Mutation Res. 46 (1977) 27-44

Lesko, S., Caspary, W., Lorentzen, R., Ts'o, P.O.P.:

Enzymic formation of 6-oxobenzo(a)pyrene radical in rat liver homogenates from carcinogenic benzo(a)pyrene. Biochemistry 14 (1975) 3978-3984

Levan, G., Levan, A.:

Specific chromosome changes in malignancy: studies in rat sarcomas induced by two polycyclic hydrocarbons. Hereditas 79 (1975) 161-198

Lewis, M.R.:

The photosensitivity of chick embryo cells growing in media containing certain carcinogenic substances. Amer. J. Cancer 25 (1935) 395

Loppes, R.:

Effect of the selective medium on the manifestation of mutations induced with mono-alkylating agents in *Chlamydomonas reinhardtii*. Mutation Res. 7 (1969) 25-34

Lorentzen, R.J., Caspary, W.J., Lesko, S.A., Ts'o, P.O.P.:

The autoxidation of 6-hydroxy-benzo(a)pyrene radical, reactive metabolites of benzo(a)pyrene. Biochemistry 14 (1975) 3970-3977

Mailath, F.P., Morik, J., Nagy, L.:

Study of transformation under natural conditions of polycyclic-aromatic hydrocarbons occurring in the environment. Egészségtudomány 19 (1975) 285-291

Mailath, F.P., Medve, F., Morik, J.:

Quantitative studies on the decomposition of 3,4-benzpyrene upon effect of ultraviolet and sunshine radiation.

Egészségtudomány 18 (1974) 333-341

Malling, H.V., Chu, E.H.Y.:

Carcinogenic and noncarcinogenic polycyclic hydrocarbons in *Neurospora crassa* and Chinese Hamster cells: their photodynamic effects.

Cancer Res. 30 (1970) 1236-1240

Masuda, Y., Karatsune, M.:

Photochemical oxidation of Benzo(a)pyrene.

Int. J. Air Water Pollut. 10 (1966) 805-811

Matoltsy, G., Fabian, G.:

Measurement of the photodynamic effect of cancerogenic substances with biological indicators.

Nature (London) 158 (1946) 899

McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.:

Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals.

Proc. Nat. Acad. Sci. 72 (1975) 5135-5139

Miller, E.C.:

Studies on the formation of protein bound derivatives of 3,4-benzpyrene in the skin of mice.

Cancer Res. 19 (1950) 232

Miller, E.C., Miller J.A.:

The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations.

In: Hollaender, A. (ed.): Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.

Plenum Press, New York, London (1971) 83-119

Morgan, D.D., Warshawsky, D.:

The photodynamic immobilization of artemia salina nauplii by polycyclic aromatic hydrocarbons and its relationship to carcinogenic activity.

Photochem. Photobiol. 25 (1977) 39-46

Morgan, D.D., Warshawsky, D., Atkinson, T.:

The relationship between carcinogenic activities of polycyclic aromatic hydrocarbons and their singlet, triplet, and singlet-triplet splitting energies, and phosphorescence lifetimes.

Photochem. Photobiol. 25 (1977) 31-38

Morimura, Y., Kotin, P., Falk, H.L.:

Photodynamic toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in tissue culture.

Cancer Res. 24 (1964) 1249-1259

Moriconi, E., Rakoczy, B., O'Connor, W.F.:

Ozonolysis of polycyclic aromatics VIII. Benzo(a)pyrene.

J. Amer. Chem. Soc. 83 (1961) 4618-4623

Morton, J.J., Luce-Clausen, E.M., Mahoney, E.B.:

Visible light and skin tumors induced with benzpyrene in mice.

Cancer Res. 2 (1942) 256-260

Mottram, J.C., Doniach, I.:

The photodynamic action of carcinogenic agents.

Lancet 1 (1938) 1156

Mueller, G.C. Rusch, H.P.:

Irradiated benzpyrene and inhibition of urease activity.

Cancer Res. 3 (1943) 113-116

Nagata, C., Tagashira, Y., Kodama, M.:

Metabolic activation of benzo(a)pyrene: significance of the free radical.

In: P.O.P. Ts'o, J.A.Di Paola (eds.): Chemical Carcinogenesis, Dekker, New York (1974) 87-111

Newbold, R.F., Wigley, C.B., Thompson, M.H., Brookes, P.:

Cell-mediated mutagenesis in cultured Chinese Hamster cells by carcinogenic polycyclic hydrocarbons: nature and extent of the associated hydrocarbon-DNS reaction.

Mutation Res. 43 (1977) 101-116

Nishioka, H., Yokoyama, S.:

Co-mutagenesis of UV and polycyclic hydrocarbons in E.coli. Radiation Res. 14 (1973) 101

Oesch, F., Bently, E. Glatt, H.R.:

Prevention of benzo(a)pyrene induced mutagenicity by homogeneous epoxide hydratase.

Int. J. Cancer 18 (1976) 448-452

Oesch, F., Glatt, H.R.:

Evaluation of the importance of enzymes involved in the control of mutagenic metabolites.

IARC Publication 12 (1976) 255-295

Oesch, F., Raphael, D., Scheind, H., Glatt, H.R.:

Species differences in activating and inactivating enzymes related to the control of mutagenic metabolites.

Arch. Toxicol. 39 (1977) 97-108

Paalme, F., Gubergrits, M.:

La cinétique du photolyse du benzo(3,4)pyrene en solution d'octane aere.

Eesti NSV Tead. Akad. Toim. Keem. Geol. 17 (1968) 99-104

Paalme, L. Gubergrits, M.:

Kinetics of 3,4-benzopyrene photochemical degradation in aerated benzene solution.

Eesti NSV Tead. Akad. Toim. Keem. Geol. 16 (1967) 32-36

Paalme, L., Gubergrits, M.:

Kinetics of photochemical oxidation of 3,4-benzopyrene in acetone solution.

Eesti NSV Tead. Akad. Toim. Keem. Geol. 20 (1971) 31-35

Preussmann, R.:

Chemische Karzinogene in der menschlichen Umwelt.

In: Altmann, H.H., Büchner, F., Cottier, G., Grundmann, E., Holle, G., Letterer, E., Maschhoff, W., Roulet, F., Seifert, G., Siebert, G., (Hrsg.):

Handbuch der Allgemeinen Pathologie Bd. 6/6, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1975) 430-557

Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A., Westwood, F.R.:

An Evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens.

Br. J. Cancer 37 (1978) 873-959

Raab, O.:

Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien.

Z. biol. 39 (1900) 524-546

Raha, C.R., Keefer, L.K., Loo, J.:

Spectral and other properties of some oxygenated derivatives of benzo(a)pyrene.

J. Chem. Eng. Data 19 (1973) 322-334

Regan, J.D., Francis, A.A., Dunn, W.C., Hernandez, O.,
Yagi, H., Herina, D.M.:

Repair of DNA damaged by mutagenic metabolites of
benzo(a)pyrene in human cells.

Chem. Biol. Interact. 20 (1978) 279-287, Chemical Abstracts
71858 j

Reichert, J.K.:

Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden.

Arch. Hyg. 152 (1968) 256-276

Reske, G., Stauff, J.:

Modellversuche zur chemischen Karzinogenese und zum photo-
dynamischen Effekt von 3,4-Benzpyren und UV-Licht in
wässrigen Proteinlösungen mit verschiedener SH-Gruppen-
reaktivität.

Z. Naturforsch. 19 b (1964) 716-726

Rüdiger, H.W., Kohl, F., Mangels, W., von Wichert, W.,
Bartram, C.R., Wöhler, W., Passarge, E.:

Benzpyrene induces sister chromatid exchanges in cultured
human lymphocytes.

Nature 262 (1976) 290-292

Santamaria, L.:

Photodynamic action and carcinogenicity in polycyclic hydro-
carbons.

Acta Unio Inter, Contra Cancrum 19 (1963) 591-598

Santamaria, L., Giordano, G.G., Alfisi, M., Cascione, F.:

Effects of light on 3,4-benzpyrene carcinogenesis.

Nature (London) 210 (1966) 824-825

Sawicki, E., Hauser, T.R., Elbert, W.C., Fox, F.T., Meeker, J.E.:
Polynuclear aromatic hydrocarbon composition of the atmosphere
in some large American cities.

Amer. Ind. Hyg. Assoc. J. 23 (1962) 137-142

Schimmer, O.:

Mutagenic effect of xanthotoxin (methoxsalen) in the green
alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Plant. Sci. Lett. 5 (1975) 83-88

Schimmer, O.:

Schnelltest auf mutagene Wirksamkeit von Arzneistoffen mit Hilfe
eines Algentestsystems.

Dtsch. Apoth. Ztg. 117 (1977) 203-206

Schimmer, O., Arnold, C.G.:

Untersuchungen über Reversions- und Segregationsverhalten eines
außerkaryotischen Gens von *Chlamydomonas reinhardtii* zur Be-
stimmung des Erbträgers.

Molec. Gen. Genetics 107 (1970) 281-290

Schimmer, O., Hauber, G.:

Untersuchungen zur mutagenen Wirksamkeit von Cumarinderivaten
in *Chlamydomonas*.

Mutation Res. 44 (1977) 21-31

Schimmer, O., Werner, R.:

Mutagenic effect of aflatoxin B₁ on nuclear and extranuclear
DNA in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Mutation Res. 26 (1974) 423-425

Schlipköter, H.W., Brockhaus, A., Weisser, E.:

Die Belastung des Großstadtmenschen durch feste und flüssige
Fremdaerosole.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 198 (1965) 113-117

Schroeder, T.M.:

Genetische Faktoren der Krebsentstehung.

Fortschr. Med. 90 (1972) 601-640

Schwedt, G.:

Chromatographische Trennmethode.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1979)

Seifert, B.:

Stability of benzo(a)pyrene on silica gel plates for high-performance thinlayer chromatography.

J. Chromatogr. 131 (1977) 417-421

Selkirk, J.K., Croy, R.G., Gelboin, H.V.:

Benzo(a)pyren metabolites: efficient and rapid screening methods for environmental carcinogens.

Science 184 (1974) 169-171

Selkirk, J.K., Croy, R.G., Wiebel, F.J., Gelboin, H.V.:

Differences in benzo(a)pyrene metabolism between rodent liver microsomes and embryonic cells.

Cancer Res. 36 (1976) 4467-4479

De Serres, F.:

Mutagenicity of chemical carcinogens.

Mutation Res. 41 (1976) 43-50

Sims, P., Grover, P.L.:

Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbons. Metabolism and carcinogenesis.

In: Klein, G., Weinhouse, S. (eds.):

Advances in Cancer Research Bd. 20, Academic Press, New York (1974) 166-275

Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K., Hewer, A.:
Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-
epoxid.

Nature (London) 252 (1974) 326-328

Stephano, G.S.:

A tentative microbiological assay for carcinogenicity below the
microgram level.

Microchem. J. Symp. Series 1 (1961) 115-132

Stich, M.F., San, R.H.C.:

DNA repair synthesis and survival of repair deficient human
cells exposed to the K-region epoxide on benz(a)anthracene.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142 (1973) 155-158

Sugimura, T.:

Is carcinogenesis related to somatic mutation?

Cancer Bull. - UICC 12 (1974) 1-3

Sugimura, T., Yahagi, T., Nago, N., Takeuchi, M., Kawachi, T.:

Validity of mutagenicity tests using microbes as a rapid
screening method for environmental carcinogens.

IARC Publication 12 (1976) 81-104

Tebbens, B.D., Mukai, M., Thomas, J.:

Fate of arenes incorporated with airborne soot: effect of
irradiation.

Am. Ind. Hyg. Ass. J. 32 (1971) 365-372

Teranishi, K., Hamada, K., Warnabe, H.:

Quantitative relationship between carcinogenicity and mutageni-
city of polyaromatic hydrocarbons in *Salmonella typhimurium*
mutants.

Mutation Res. 31 (1975) 97-102

Thielemann, H.:

Untersuchungen zur Frage der Toxizität, dünnschichtchromatographischen Trennung und Identifizierung bei der Trinkwasseraufbereitung durch Chlor bzw. Chlordioxid und 3,4-Benzpyren entstehenden Chinonverbindungen (3,4-Benzpyren-1,5-chinon, 3,4-Benzpyren-5,8-chinon und 3,4-Benzpyren-5,10-chinon).
Wasser- und Abwasserforschung 6 (1972) 176-177

Ts'o, P.O.P., Lesko, S.A., Umans, R.S.:

The physical binding and the chemical linkage of benzpyren to nukleotides, nucleic acids and nucleohistones.
Israel Acad. Sci. Humanities (1969) 106-135

Vollmann, H., Becker, H., Corell, M., Streeck, H.:

Beiträge zur Kenntnis des Pyrens und seiner Derivate.
Ann. Chem. 531 (1937) 51-52, 129-130

Waibel, M., Wanner, H.U.:

Schwebestaubmessungen und Bestimmungen des 3,4-Benzpyrengehaltes in Zürich.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 159 (1974) 169-177

Weinstein, D., Katz, L., Kazmer, S.:

Chromosomal effects of carcinogens and non-carcinogens of WI-38 after short term exposures with and without metabolic activation.
Mutation Res. 46 (1977) 297-307

Wettig, K.,

Thin-layer chromatography of some polycyclic quinones.
Gigiena i Sanit. 20 (1964) 56-57, Chemical Abstracts 62 (1965) 9754

Wiebel, E.J., Gelboin, H.V.:

Cutaneous carcinogenesis: metabolic interaction of chemical carcinogens with skin.

In: Handbook of Physiology, Waverly Press, Baltimore (1977) 337-347

Wiegrebe, W.:

Antisporiatisch wirksame Medikamente.

Pharmazie heute 2 (1978) 134-138

Wilk, M., Bez, W., Rochlitz, J.:

Neue Reaktionen der karzinogenen Kohlenwasserstoffe 3,4-Benzpyren, 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen und 20-Methylcholanthren.

Tetrahedron 22 (1966 a) 2599-2608

Wilk, M., Bez, W., Rochlitz, J.:

Neue Reaktionen der karzinogenen Kohlenwasserstoffe 3,4-Benzpyren, 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen und 20-Methylcholanthren.

In: Molekulare Biologie des malignen Wachstums

Springer Verlag, Berlin (1966 b) 117-125

Wislocki, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Dansette, P.M., Jerina, D.M., Conney, A.H.:

Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene arene oxides, phenols, quinones, and dihydrodiols in bacterial and mammalian cells.

Cancer Res. 36 (1976) 3350-3357

Woenckhaus, J.M., Woenckhaus, Ch.W., Koch, R.:

The effect of ultraviolet and x-rays on 3,4-benzopyrene.

Z. Naturforsch. 17 b (1962) 295-299

Wolman, M.:

Photodynamic haemolysis by carcinogenic hydrocarbons.
Nature (London) 145 (1940) 592

Wulf, K., Unna, P.J., Willers, M.:

Experimentelle Untersuchungen über die photodynamische Wirk-
samkeit von Steinkohlenteerbestandteilen.
Hausarzt 14 (1963) 292-297

Wulf, K.:

Pflanzenwachstumsförderung durch photodynamisch wirksame
Substanzen.
Kurzberichte aus der Wissenschaft 2 (1968) 69

Zankl, H., Zang, K.D.:

Chromosomenanomalien und Tumorentstehung.
Klin. Wschr. 56 (1978) 7-16

Zorn, H.:

Berufliche und Umweltgefährdung durch polyzyklisch aromatische
Kohlenwasserstoffe (PAH) in Erdöl- und Kohlendestillaten bei
ihrer technologischen Anwendung in der Industrie und im
Straßenbau.
Arbeitsmedizin, Sozialmedizin, Präventivmedizin 1 (1978) 6-9

ABKÜRZUNGEN

A	=	Adenin
Ala	=	Alanin
Arg	=	Arginin
Arg ⁻	=	Arginin-Auxotrophie
Arg ⁺	=	Arginin-Prototrophie
B(a)p	=	Benzo(a)pyren (IUPAC-System) 3,4-Benzpyren (Beilsteinsystem)
B(a)p-säure	=	7H-Benz(d,e)anthracen-7-on-3,4- dicarbonsäure (IUPAC-System) Benzanthron-peri-dicarbonsäure (Beilsteinsystem)
c	=	Konzentration
C	=	Cytosin
DC	=	Dünnschichtchromatographie
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
G	=	Guanin
Gly	=	Glycin
HPTLC	=	High-performance thinlayer chromatography
Ile	=	Isoleucin
MM	=	Minimalmedium
MNNG	=	N-Methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin
NUV	=	Near ultraviolet (320-380 nm)
PAK	=	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
Rf	=	Retention factor
r-RNS	=	ribosomale Ribonukleinsäure
t-RNS	=	transfer-Ribonukleinsäure
RP	=	reversed-phase
Ser	=	Serin
SM 125-Agar- Platten	=	Agarplatten mit 125 µg/ml Streptomycin
T	=	Thymin
Thr	=	Threonin
Trp	=	Tryptophan
Tyr	=	Tyrosin

L E B E N S L A U F

Ursula Bader, geb. Oetinger,
geboren am 9. Mai 1947 in Stuttgart, als erstes Kind des Kauf-
manns Walter Oetinger und seiner Ehefrau Theresia Oetinger,
geb. Santherr.

1954	-	1956	Volksschule, Stuttgart
1956	-	1958	Volksschule, Michelau/Ofr.
1958	-	1967	Meranier-Gymnasium, Lichtenfels
1967	-	1968	Studium der Philologie und Natur- wissenschaften an der Friedrich- Alexander Universität Erlangen
1968	-	1970	Apothekerpraktikum in der Anker- Apotheke, Nürnberg
1970	-	1973	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
1973			Pharmazeutische Prüfung und Appro- bation als Apotheker
seit		1973	verheiratet
seit		1974	Fachreferent in der Medizinisch- wissenschaftlichen Abteilung der Fa. Heumann & Co.GmbH, Nürnberg
seit		1978	Mitglied des Prüfungsausschusses für Pharmareferenten der IHK Nürnberg

Herrn Prof. Dr. C. G. Arnold, Mitvorstand des Instituts für Botanik und pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg und Herrn Prof. Dr. Dr. W. Gräf, Vorstand des Instituts für Umwelthygiene und Präventivmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, bin ich sehr dankbar, daß sie mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglichten und mir einen Arbeitsplatz an ihren Instituten zur Verfügung stellten.

Der Fa. Ludwig Heumann & Co. GmbH, Nürnberg, danke ich, daß sie mir die Benutzung verschiedener Geräte bei den chemischen Arbeiten ermöglichte.

Für die Überlassung der Leberhomogenate danke ich Herrn Prof. Dr. H. Greim, Leiter der toxikologischen Abteilung, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München; für die Überlassung der nur schwer zu beschaffenden Referenzsubstanzen Herrn Dr. E. J. Moriconi, Basel, der Fa. Hoechst, Frankfurt (Main) und Herrn Prof. F. Oesch, Vorsteher der Abt. Molekularpharmakologie, Pharmakologisches Institut der Universität Mainz.

Herrn Dr. L. Bauer am Institut für Umwelthygiene und Präventivmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, Herrn Dr. O. Schimmer am Institut für Botanik und pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg, Frau Dr. Böhrer in der Fa. Heumann & Co. GmbH, Nürnberg, und Frau Dr. W. Göggelmann in der toxikologischen Abteilung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München, danke ich für wertvolle Hinweise und Diskussionen.

